



Universidad de León

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad

Aislamiento, caracterización y selección de *rhizobia* autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana.

TESIS DOCTORAL

César Antonio Díaz Alcántara

Codirectores: Fernando González Andres (ULE)
M^a de la Encarnación O. Velázquez Pérez (USAL)

2010

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	3
1.2. SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA	4
1.3. EL MACROSIMBIONTE: LAS LEGUMINOSAS	6
1.3.1. La judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	7
1.3.2. El cultivo de la judía en República Dominicana.....	9
1.4. EL MICROSIMBIONTE: LOS RHIZOBIA	11
1.4.1. Taxonomía de los rhizobia	12
1.4.2. Biodiversidad de los rhizobia	14
1.4.3. Características simbióticas de los rhizobia.....	15
1.4.4. Los rhizobia que forman simbiosis con <i>Phaseolus vulgaris</i>	17
1.4.5. Los rhizobia como inoculantes de leguminosas	18
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. PROCEDENCIA DE LOS NÓDULOS	29
3.1.1. Características de los suelos en los que se aislaron las cepas.....	30
3.1.2. Aislamiento de cepas de rhizobia a partir de nódulos de habichuela	30
3.1.3. Mantenimiento y conservación de las cepas aisladas.....	31
3.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	31
3.2.1. Extracción de DNA para PCR y secuenciación	31
3.2.2. Análisis de los perfiles de TP-RAPD	33
3.2.3. Secuenciación de DNA.....	34
3.2.4. Análisis filogenético de las secuencias	35
3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	35
3.3.1. Morfología	35
3.3.2. Fisiología.....	36
3.3.2.1. Crecimiento en diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad	36
3.3.2.2. Resistencia natural a antibióticos	36

3.3.2.3. Utilización de Fuentes de Carbono y Nitrógeno	37
3.4. ENSAYOS DE INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS.....	38
3.4.1. Producción de plantas.....	38
3.4.2. Inoculación de las plantas	39
3.4.3. Análisis de la efectividad de fijación de nitrógeno.....	40
3.5. ENSAYO EN MICROCOSMOS.....	41
3.5.1. Suelos empleados en ensayos de microcosmos	42
3.5.2. Fertilización.....	42
3.5.2.1. Fertilización nitrogenada en el testigo con nitrógeno.....	43
3.5.2.2. Fertilización fosfatada.....	43
3.5.2.3. Fertilización potásica	44
3.5.3. Diseño experimental de los ensayos en microcosmos.....	44
3.5.3.1. Operaciones durante el cultivo en microcosmos.	45
3.5.3.2. Análisis de datos.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	49
4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	49
4.2.1. Morfología macroscópica	49
4.2.2. Morfología microscópica.....	50
4.3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	51
4.3.1. Análisis de los perfiles de TP-RAPD	51
4.3.2. Secuenciación y análisis filogenético del gen ribosómico 16S	54
4.3.3. Secuenciación y análisis filogenético de los genes <i>recA</i> y <i>atpD</i>	55
4.3.4. Análisis de los genes <i>atpD</i> y <i>recA</i> concatenados.....	63
4.3.5. Análisis de los genes <i>atpD</i> y <i>recA</i> concatenados.....	64
4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	66
4.4.1. Fisiología.....	66
4.4.1.1. Crecimiento a diferentes temperaturas, condiciones de pH y salinidad	66
4.4.1.2. Resistencia natural a antibióticos	67
4.4.1.3. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno	72
4.4.1.4. Agrupamiento fenotípico.....	73
4.5. CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA	75
4.5.1. Secuenciación y análisis filogenético del gen <i>nodC</i>	75

4.6. EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA EN MEDIO HIDROPÓNICO LIBRE DE NITRÓGENO Y CONDICIONES DE ESTERILIDAD.....	79
4.7. EFECTIVIDAD EN CONDICIONES DE MICROCOSMOS.....	83
5. CONCLUSIONES	93
6. BIBLIOGRAFÍA	97

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El nitrógeno es uno de los elementos químicos esenciales para todos los seres vivos ya que forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas y, por lo tanto, es fundamental en la estructura y el metabolismo celular (Paerl, 1998). Las plantas toman el nitrógeno directamente desde el suelo en forma de nitratos (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), algo que no pueden hacer los animales, que precisan tomarlo en forma de compuestos orgánicos. Sólo algunos procariontes pueden tomar el nitrógeno directamente desde la atmósfera, vía fijación de nitrógeno, convirtiendo el nitrógeno molecular en nitrógeno asimilable por otros seres vivos. Teniendo en cuenta que este elemento es muy abundante en la atmósfera, la obtención de nitrógeno directamente desde ésta es una de las vías más importantes para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno, del que forman parte las bacterias fijadoras de nitrógeno, junto con otros grupos de bacterias que llevan a cabo procesos intermedios de transformación de compuestos nitrogenados y de desnitrificación, que devuelve finalmente el nitrógeno a la atmósfera. Por lo tanto, la existencia de un equilibrio en el ciclo del nitrógeno es fundamental para la vida en la tierra y esto conlleva el mantenimiento de los ecosistemas microbianos presentes en los medios terrestres y acuáticos.

La fijación biológica de nitrógeno supone más del 60% de la fijación global del nitrógeno en la tierra y los microorganismos que llevan a cabo este proceso se denominan diazotrofos (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Raymond *et al.*, 2004). La enzima responsable de la fijación de nitrógeno se denomina nitrogenasa y está compuesta por dos metaloproteínas, una con Fe (ferroproteína o nitrogenasa reductasa) y otra con Fe y Mo (ferromolibdoproteína o nitrogenasa propiamente dicha) como grupos activos.

Dentro de los diazotrofos hay muchas especies que llevan a cabo la fijación de nitrógeno en vida libre, mientras que otras lo hacen a través de asociaciones simbióticas con plantas. Los fijadores de vida libre están distribuidos en numerosos grupos de bacterias que comprenden bacterias anaerobias como *Clostridium*, anaerobias facultativas como *Klebsiella* y aerobias como *Azospirillum*, *Azotobacter* o *Beijerinckia* (De Felipe, 2006).

Algunos de estas bacterias fijadoras en vida libre son endofíticas de plantas y colonizan los espacios intercelulares radiculares de la planta hospedadora. En algunas de estas asociaciones se ha demostrado la incorporación del nitrógeno fijado a la planta, como ocurre con *Gluconacetobacter* (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003), *Azospirillum* (Berg *et al.*, 1980) y *Herbaspirillum* (Vargas *et al.*, 2003) que son endofitos de caña de azúcar y contribuyen a su fertilización nitrogenada. Existen también estudios que muestran que algunas especies de bacterias pertenecientes a los géneros *Azoarcus*, *Azospirillum* y *Burkholderia* (Govindarajan *et al.*, 2007; Hurek y Reinhold-Hurek, 2003; Kao *et al.*, 2003; Reinhold-Hurek y Hurek 1998) penetran en las raíces del arroz y aumentan la presencia de compuestos nitrogenados.

Varios grupos de procariontas son capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas superiores y dentro de éstas cabe destacar la simbiosis establecida por cianobacterias del género *Anabaena* y el helecho *Azolla* que tiene una gran importancia para los cultivos de arroz (Peters, 1977), la establecida entre *Frankia* y plantas actinorrizas que supone un gran aporte de nitrógeno en sistemas forestales (Benson y Silvester, 1993) y, sobre todo, la establecida entre diferentes grupos de bacterias, englobados en el término rhizobia, y las leguminosas (Velázquez *et al.*, 2010).



Figura 1. Simbiosis de diferentes plantas y bacterias: A) *Phaseolus*-rhizobia. B) *Alnus*-*Frankia*. C) *Azolla*-*Anabaena*

La eficiencia de la fijación de nitrógeno es relativamente baja en el caso de los fijadores libres ya que el nitrógeno fijado es posteriormente metabolizado y eliminado por desnitrificación y lavado. La fijación en vida libre sólo aporta al suelo unos cientos de gramos de nitrógeno por hectárea y año que, si bien son suficientes en condiciones naturales, están muy lejos de satisfacer las necesidades de los cultivos (Olivares, 2004). Sin embargo, la fijación en simbiosis es mucho más eficiente, calculándose que sólo la asociación rhizobia-leguminosa puede llegar a aportar más de 300 kilogramos por hectárea y año. Por ello determinados cultivos de leguminosas no requieren fertilización nitrogenada para que se incremente su contenido en proteínas, contribuyendo además al enriquecimiento del suelo en nitrógeno, que puede ser aprovechado por cultivos asociados o por las plantaciones posteriores en una rotación de cultivos (Urzúa, 2005).

1.2. SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

La asociación mutualista de rhizobia y leguminosas ha sido desde siempre la más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial. Ambos partícipes son capaces de vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción que se caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas, se forman en la raíz. Los nódulos son órganos especializados que se desarrollan como resultado de un diálogo molecular por parte de los rhizobia y de las plantas (Gibson 2008).

El establecimiento de una simbiosis rizobia-leguminosa eficiente conlleva una serie de etapas que comienzan con un intercambio de señales entre ambos organismos: las raíces de la planta liberan a la rizosfera flavonoides (Spaink *et al.*, 1998), moléculas de naturaleza fenólica que promueven la expresión en las bacterias de los genes *nod*, lo cual origina la síntesis y secreción de lipo-oligoquitinas llamadas factores nod (Geurts *et al.*, 2005; Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1998). Éstas son percibidas por la raíz de la planta, la cuál experimentará diversos cambios dependiendo del tipo de leguminosa (Bauer y Mathesius, 2004).

En las leguminosas en las que la infección se produce a través de pelos radicales se produce una deformación de los mismos que origina un cambio en la dirección del crecimiento, produciéndose en el extremo apical la morfología típica denominada “cayado de pastor”, de modo que algunas de las bacterias quedan recluidas en el interior de la curvatura de la misma. Estas bacterias inducen una degradación local de la pared celular de la planta (Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008), la membrana plasmática se invagina y los rhizobia entran en su interior. En otros casos, como ocurre en la nodulación del cacahuate (*Arachis hypogea*) por bacterias del género *Bradyrhizobium*, la entrada es directa por los espacios intercelulares que se abren al emerger las raíces laterales, lo que se conoce como *crack entry* (Bhuvanewari *et al.*, 1981; Booger y van Rossum, 1997; De Lajudie *et al.*, 1998a). En el caso de *Phaseolus* la entrada de los rhizobia es mixta, por pelos radicales y por *crack*.

Los rhizobia, una vez invadidas las células de la planta, proliferan y se diferencian a bacteroides, responsables de la fijación de nitrógeno, que están rodeados por una membrana peribacteroidea de origen vegetal y constituyen un nuevo orgánulo denominado simbiosoma. La planta aporta esqueletos carbonados para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte, el bacteroide aporta amonio en forma de diferentes aminoácidos a la planta (Lodwig y Poole, 2003). Para que tenga lugar la reducción de N_2 , el ambiente del simbiosoma debe ser microaerobio, puesto que la nitrogenasa es muy sensible a la oxidación por O_2 (Zehr *et al.*, 1993). La protección de la nitrogenasa frente al oxígeno la lleva a cabo la leghemoglobina, una proteína monomérica cuya función es combinarse con gran afinidad con el oxígeno, transportándolo hasta la membrana de los simbiosomas, manteniendo en su interior una concentración de O_2 libre de tan sólo 10-50 nM. Por eso, los nódulos efectivos presentan una coloración rojiza debido a la presencia de leghemoglobina.



Figura 2. Corte de un nódulo en el que se evidencia la presencia de leghemoglobina

1.3. EL MACROSIMBIONTE: LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas son un grupo de plantas que se incluyen en la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsidae, y Orden Fabales (Cronquist, 1988). Su nombre deriva del latín *legumen* (semillas con vaina). Actualmente se acepta que todas las leguminosas pertenecen a una familia denominada Fabaceae con tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae (Lewis, 2005). 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 y Allen, 1981). En la subfamilia *Caesalpinioideae* se han encontrado nódulos en pocos de los géneros estudiados (Allen y Allen, 1981; Foster *et al.*, 1998; Sprent *et al.*, 1993).

Junto con los cereales, las leguminosas fueron las primeras plantas cultivadas por el hombre. Hace unos 10.000 años, en el Neolítico, en la región del Próximo Oriente situada entre los ríos Tigris y Eufrates, los asentamientos humanos comenzaron una recolección preferencial de los frutos de la asociación existente entre plantas de trigo, cebada, yeros y guisantes, produciéndose así el primer paso hacia el nacimiento de la Agricultura, de la cual hay constancia en los restos fósiles de plantas de trigo, cebada, lentejas y guisantes ya domesticadas con unos 8.000 años de antigüedad. En América, las judías se consumen desde la época precolombina en combinación con maíz (Boyd *et al.*, 2008; Finucane *et al.*, 2006).

En la actualidad, muchas de las especies de la familia *Fabaceae* tienen una gran importancia económica sobre todo por su interés en alimentación humana y animal. Aunque algunas leguminosas tienen aplicaciones medicinales, industriales u ornamentales, desde el punto de vista agrícola, el grupo de las leguminosas es sobre todo interesante porque se pueden cultivar bien en terrenos pobres en nitrógeno y emplearse también como abonos verdes. Las leguminosas tienen un elevado valor alimenticio por su contenido protéico y glucídico y constituyen la segunda fuente de alimentos a nivel mundial (Velázquez *et al.*, 2010). Las principales leguminosas producidas en el mundo son la soja (*Glycine max*) y el cacahuete (*Arachis hypogaea*) y después de ellas las judías (*Phaseolus*), los guisantes (*Pisum sativum*), los garbajos (*Cicer arietinum*), las lentejas (*Lens culinaris*) y las habas (*Vicia faba*).

Las leguminosas, junto con los cereales, constituyen la principal fuente de proteínas de origen vegetal en los países en vías de desarrollo (Figura 3). Una adecuada combinación de ambos contiene los aminoácidos suficientes para el hombre (Ejigui *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2008) ya que la deficiencia en algunos aminoácidos como la metionina o la cisteína (Friedman *et al.*, 2001; Sathe *et al.*, 2002) puede compensarse con la combinación con cereales deficientes en lisina (Pellett y Ghosh, 2004).



Figura 3. Granos de diversas leguminosas empleados en la alimentación humana.

En la República Dominicana por lo general las leguminosas se consumen con arroz, lo que contribuye a una mayor asimilación de sus proteínas, al tener el arroz aminoácidos complementarios a los aminoácidos de las leguminosas. El valor de la producción de las leguminosas en la República Dominicana oscila alrededor de los 700 millones de pesos dominicanos, que es aproximadamente una cuarta parte (1/4 parte) del valor de la producción de arroz. En 1997, el valor de la producción de las leguminosas se estimó en 669 millones de pesos (Banco Central de la República Dominicana, 1998). El gasto mensual promedio en leguminosas de una familia en República Dominicana durante el año 1998 fue de RD\$ 102,33, o sea un 4% del gasto mensual de la canasta familiar agropecuaria, que fue de RD\$ 2.558 (SEA; citado por Núñez, 1999, IICA, 2000).

1.3.1. La judía (*Phaseolus vulgaris*)

La judía (*Phaseolus vulgaris*) puede ser de dos tipos, herbáceo o rastrero. En general, los tipos herbáceos se prefieren para la producción comercial, pues su crecimiento y porte erecto está muy bien determinado ya que la mayor parte del herbaje madura a la vez, facilitando así la cosecha mecanizada. La planta cuenta con un sistema radicular bien ramificado. La de tipo herbáceo y porte erecto tiene un tallo central bien desarrollado y ramas con hojas trifoliadas. Las hojas y los tallos son ligeramente vellosos. Las flores son pequeñas, labiadas y su color varía del blanco al azul. Las flores se autopolinizan, por lo cual la semilla generalmente conserva los buenos caracteres hereditarios.

Las flores polinizadas producen legumbres de forma recta o encorvada, de 10 a 15 centímetros de longitud, que contienen entre 5 y 10 semillas (Figura 4). El color de las semillas en las distintas variedades puede variar de blanco a rosado, rojo, jaspeado y de castaño a azul-negro. También es considerable la variación en tamaño que oscila de 20.000 a

60.000 semillas por kilogramo. Algunas variedades de alubia se cultivan por sus vainas comestibles (legumbres) y sus semillas tiernas; éstas no tienen vainas fibrosas. Todas las variedades de alubias secas pueden cosecharse prematuramente para cocinarse y comerse verde. Las variedades trepadoras son de temporada más larga, pero el pequeño productor gusta de ellas porque pueden servir en sistemas asociados de siembra, en particular, con el maíz.



Figura 4. Plantas de *Phaseolus vulgaris*

Las variedades de *P. vulgaris* común actualmente cultivadas son el resultado de un proceso de domesticación y evolución a partir de un espécimen silvestre, *P. vulgaris* var. *arborigineus* (Brücher, 1988), procedente del continente americano en el área comprendida entre el norte de México y el noroeste de Argentina, pudiendo reconocerse dos grupos de germoplasma tanto en judías silvestres como en cultivadas: Andino y Mesoamericano (Singh, 1991); ambos grupos se pueden distinguir por marcadores morfológicos y agronómicos (tamaño de la semilla, forma y pilosidad de folíolos, etc.) (Gepts y Debouck, 1991; Singh, 1991) y bioquímicos (faseolina e isoenzimas) (Gepts y Bliss, 1986; Koenig y Gepts, 1989; Singh, 1991). Los restos más antiguos datan de entre 10.000 y 8.000 años a.C., en los Andes, y de 6.000 años a.C. en Mesoamérica. El cultivo de la judía se ha extendido a países de todos los continentes después del descubrimiento de América por los españoles que fueron los que introdujeron esta leguminosa en Europa y en otros países de América como la República Dominicana.

La producción de *P. vulgaris* tiene múltiples utilidades. Se cultiva para la alimentación humana, consumiéndose generalmente sus vainas verdes (judías o fréjoles verdes), los granos tiernos o los granos secos (frijoles o habichuelas). 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, que también son usados como abono verde y en países pobres como combustible para cocinar. Estudios clínicos demuestran que el consumo regular de judía ayuda en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades del tubo digestivo, reduciendo el nivel de

colesterol y glucosa en sangre (Singh y 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 judía son glúcidos, proteínas, lípidos, sustancias minerales y fibra (Figura 7). Además destaca su alto contenido en calcio y hierro y vitaminas como tiamina (B1) y ácido fólico (Gómez, 1983; Lareo, 1988; Santalla, 1995).

Todavía no se ha determinado la mejor descripción de la variedad ideal de habichuela, evidentemente, la estructura ideal de una variedad que deba satisfacer las necesidades de la agricultura mecanizada no tiene que ser la misma que para una habichuela que se desee cultivar asociado con otro cultivo, como el maíz. En cualquier caso, las características vegetales deseadas para las variedades deseadas de habichuelas, deben incluir un tallo erecto, de modo que las vainas queden a cierta distancia del suelo, con grano que madure uniformemente y que las semillas no escapen de la vaina al madurar. Estas características son compatibles con la adaptación a condiciones específicas del clima y del suelo, alto potencial de rendimiento en condiciones favorables, y resistencia o tolerancia a las enfermedades y plagas de insectos localmente importante. La forma, el tamaño y el color de la semilla son características hereditarias y deben combinarse con otros rasgos deseables.

1.3.2. El cultivo de la judía en República Dominicana

En la República Dominicana y, en general, en toda América Latina, la judía se denomina frijol o habichuela y todo parece indicar que fue introducida en la República Dominicana por los colonizadores españoles, ya que éste es uno de los productos básicos para la preparación de diversos platos hispanos. Pero también se cree que la habichuela pudo llegar a través de la República de Haití, motivado por la denominación que recibe la variedad roja, "Pompadour", que recuerda a la célebre Marquesa de Pompadour durante el reinado de Luis XV en Francia. En las últimas décadas, se han introducido también variedades de habichuelas rojas desde Colombia y Brasil, pero han presentado inconvenientes en lo referente a adaptación y resistencia al ataque de plagas y enfermedades.

La variedad que más se consume en República Dominicana es la habichuela roja, la cuál se intercambia con la habichuela negra, la habichuela blanca, la habichuela pinta importada y los gandules (*Cajanus cajan*). En el país se siembran unas 900.000 taréas, equivalente a 56.250 hectáreas de leguminosas al año, principalmente de habichuela roja. La producción es de alrededor de un millón (1.000.000) de quintales al año. (Figura 5) Los gandules son en su mayoría producidos para exportación. La habichuela que más se importa es la pinta, la cuál proviene de los Estados Unidos de América.

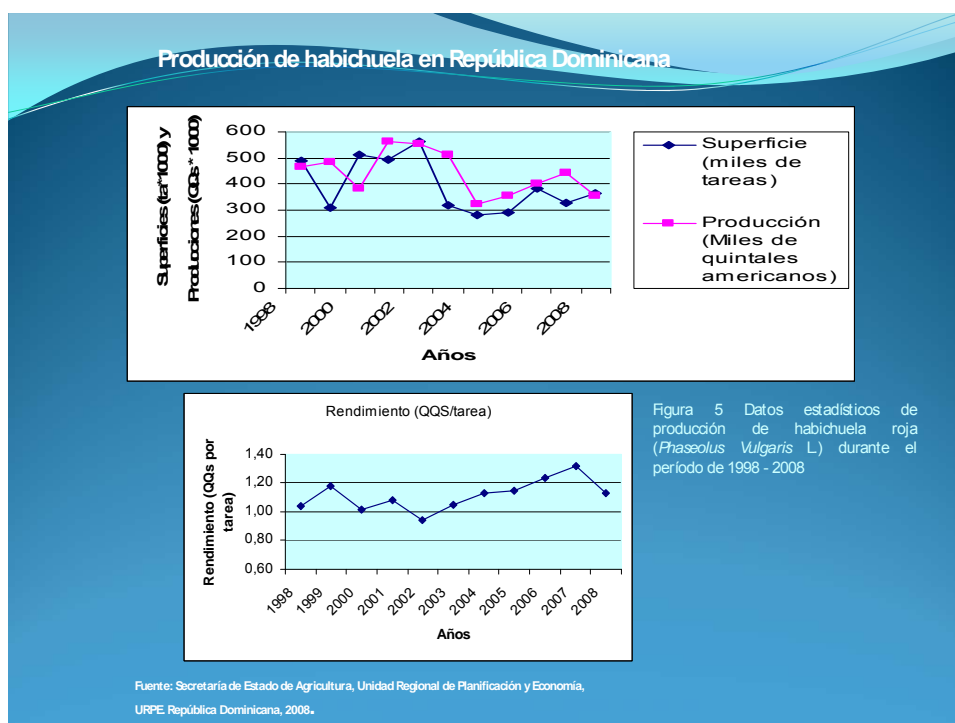


Figura 5. Producción de habichuela en República Dominicana.

En la República Dominicana, la variedad de habichuela que más se cultiva es la pompadour, que tiene un grano rojo matizado y de forma ovoidea. Dentro de esta variedad, se distinguen los tipos checa, mocana y rocío. En los últimos tiempos, se ha fomentado el cultivo José Beta, que se diferencia de los otros tipos por tener el grano de mayor tamaño y una proporción mayor de vetas blancas en su cáscara. También también se cultivan en República Dominicana las variedades de habichuelas negras Venezuela-22 y Venezuela-44.

Las distintas clases de habichuelas, al igual que otros miembros de la familia de las leguminosas, son capaces de satisfacer una parte importante de sus necesidades de nitrógeno mediante la fijación de este elemento, a partir del nitrógeno atmosférico, por medio de nódulos radiculares que contienen a los rhizobia. Por lo tanto, la habichuela es básicamente independiente del nitrógeno del suelo, sin embargo, cuando se cultiva en temporadas muy cortas, el agregar cierta cantidad de fertilizante nitrogenado o hacer el cultivo en suelo fértil, es una gran ayuda para propiciar el crecimiento rápido y mayores rendimientos.

El efecto residual del cultivo de la habichuela es aumentar la fertilidad de la tierra para los siguientes cultivos; hay diferencias significativas entre las distintas variedades en cuanto a su tolerancia al calor y a la sequía. Así podemos decir que el *Phaseolus acutifolius* tiene el prestigio de producir una cosecha en 69 y 90 días en climas cálidos y secos, siempre que la humedad del suelo sea adecuada para tan breve periodo de desarrollo y maduración.

Otras variedades tropicales pueden requerir hasta 91 a 110 días para madurar, y aún éstas difieren en cuanto a tolerancia al calor. También se dan diferencias entre las variedades en su forma de reaccionar a la humedad del aire, pero en términos generales, la habichuela es más productiva en las regiones de mayor humedad, principalmente porque muchas plagas de insectos y enfermedades atacan las hojas y los tallos en las regiones donde la lluvia es ligera al final de la fase de crecimiento. Otras leguminosas prosperan cuando la humedad del aire es demasiado alta para el buen rendimiento de la habichuela.

Phaseolus vulgaris germina a partir de los 10°C, pero es necesario sembrarlo con una temperatura media de 15°C. Florece normalmente con ésta última media y madura a los 18-20°C. La habichuela teme al frío durante todas las fases vegetativas y muere a -1°C. Necesita luz y aire para florecer y fructificar. Sin embargo, existen muchas variedades que temen a la gran intensidad solar que provoca la desecación de las flores (variedades de climas templados). En clima tropical y sub-tropical la siembra se efectúa de septiembre a diciembre en la parte baja y todo el año en la parte alta de la República Dominicana.

En muchas zonas de América Latina y del Caribe los rendimientos obtenidos en los cultivos son con frecuencia bajos, por lo que es necesario aportar fertilizantes de manera racional, debido al alto coste relativo de los mismos. Dentro de las acciones encaminadas a alcanzar una fertilización racional, una de las más importantes es incrementar el aporte de N mediante la asociación simbiótica entre las raíces de los cultivos de especies nitro fijadoras y cepas de *rhizobia* eficientes en la fijación de N₂. Esta estrategia puede ser esencial para conseguir la sostenibilidad económica y agrícola del cultivo de la alubia en zonas tropicales (Hungria *et al.*, 2000, 2003; Motasso *et al.*, 2002; Alberton *et al.* 2006). La inoculación de suelos y plantas con *rhizobia*, es una de las formas más racionales y eficaces de introducir simbiontes efectivos y recibe el nombre de biofertilización. Para que la biofertilización sea una práctica útil, es necesario optimizar la eficiencia en la fijación del nitrógeno (Sessitsch *et al.* 2002). Una de las mejores opciones es el aislamiento y selección de cepas autóctonas de alta efectividad a partir de las zonas donde la especie es autóctona o hay una larga tradición de cultivo, para utilizarlas como biofertilizantes y es la estrategia adoptada en la tesis (Motasso *et al.* 2002, González-Andrés and Ortiz, 1999; González-Andrés *et al.*, 2004, 2005).

1.4. EL MICROSIMBIONTE: LOS RHIZOBIA

Los microorganismos capaces de establecer simbiosis con leguminosas se conocen con el nombre de rhizobia o rizobios y engloban actualmente a una gran variedad de bacterias. El conocimiento de la existencia de estos microorganismos data de finales del siglo XIX cuando, por primera vez, Frank en 1889 denominó *Rhizobium leguminosarum* a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas. Fue este nombre el que dió origen al

générico de rhizobia para designar a todas las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. No obstante, aunque algunos autores consideran rhizobia a todas aquellas bacterias capaces de nodular, otros distinguen entre los verdaderos rhizobia, pertenecientes a las α -Proteobacteria e incluidos en la actualidad en 5 géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (actualmente denominado *Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, y las bacterias no-rhizobia capaces de nodular, constituidas por cepas de algunos géneros pertenecientes a la clase α -Proteobacteria como *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum* y de otros géneros pertenecientes a la clase β -Proteobacteria (Moulin *et al.*, 2001) como *Cupriavidus* y *Burkholderia* (Tabla 1).

Los rhizobia “clásicos” se incluyen actualmente en el orden *Rhizobiales* (Kuykendall, 2005) y se encuentran distribuidos en varias familias. Los antiguos géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Allorhizobium* se han fusionado en un sólo género y actualmente todas sus especies se incluyen en el género *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001). Este género junto con género *Sinorhizobium* que ha pasado a denominarse *Ensifer* (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008) y con el nuevo género *Shinella* (An *et al.*, 2006) se incluye en la familia *Rhizobiaceae*. El género *Mesorhizobium* junto con el género *Phyllobacterium* se ha incluido en una nueva familia denominada *Phyllobacteriaceae* (Mergaert and Swings, 2005). El género *Azorhizobium* que forma nódulos en tallos de *Sesbania* se incluye en la familia *Hyphomicrobiaceae* (Kuykendall, 2005). Finalmente, el género *Bradyrhizobium* se incluye en la familia *Bradyrhizobiaceae* (Kuykendall, 2005).

Actualmente el género *Rhizobium* contiene 34 especies e incluye a los antiguos géneros *Agrobacterium* y *Allorhizobium*. El género *Sinorhizobium*, actualmente denominado *Ensifer*, contiene 12 especies, el género *Mesorhizobium*, 20 especies, el género *Phyllobacterium*, 8 especies, el género *Azorhizobium*, 2 especies, el género *Bradyrhizobium* contiene 9 especies y el género *Shinella* contiene 4 especies (Tabla 1).

1.4.1. Taxonomía de los rhizobia

La clasificación, identificación y nomenclatura de los rhizobia sigue las normas de la Taxonomía bacteriana. La clasificación es la estructuración de los organismos 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 y Socal, 1973). La identificación consiste en determinar la identidad de un aislado como miembro de un taxón establecido, teniendo en cuenta que el grupo taxonómico básico en taxonomía bacteriana es la especie. La especie es un grupo de cepas que comparten características fenotípicas y genotípicas que son diferentes significativamente de otros grupos de cepas.

Por lo tanto, para identificar o clasificar una cepa aislada a partir de nódulos de leguminosas deben estudiarse una serie de caracteres, tanto fenotípicos como genotípicos, que permitan determinar su relación con los taxones establecidos. Una vez recogidas suficientes características de un aislado, puede procederse a su clasificación dentro de un taxón determinado. La clasificación puede ser de tipo fenético que agrupa a las bacterias en función de sus características fenotípicas o filogenético que las agrupa en función de sus relaciones evolutivas. Lo ideal es aplicar ambos tipos de esquemas en la clasificación y descripción de las especies, aplicando los principios de la "Taxonomía Polifásica" (Colwell, 1970) que recoge e integra diversos niveles de información, desde moleculares a ecológicos, para crear una taxonomía multidimensional. En la actualidad, y siguiendo los principios de la Taxonomía Polifásica, la taxonomía de los rhizobia se basa en características fenotípicas, genotípicas y simbióticas (Amarger, 2001; Graham *et al.*, 1991; Lindström y Young; 2009).

La caracterización fenotípica de los rhizobia, al igual que la de otras bacterias, debe incluir fundamentalmente la descripción morfológica de células y colonias, la velocidad de crecimiento y las condiciones de cultivo en las que se produce, la asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, la producción de exoenzimas y la resistencia natural a antibióticos. No obstante, este tipo de clasificación (fenética) no está muy desarrollada en el caso de los rhizobia puesto que no se han estudiado este tipo de características de manera uniforme en todas las cepas por lo que su utilidad está prácticamente limitada, por el momento, a la descripción de nuevas especies.

Por el contrario, la clasificación filogenética, gracias a los avances de la Biología Molecular, constituye actualmente la principal herramienta para la taxonomía de los rhizobia. Los genes analizados en este grupo de bacterias son similares a los utilizados en otros grupos considerándose a los genes ribosómicos la mejor diana para el estudio de las relaciones filogenéticas debido a su presencia en todas las bacterias, su constante funcionalidad y su composición altamente conservada en todos los dominios (Stackebrandt y Goebel, 1994; Woese, 1987). Las secuencias de los genes que codifican para el ARN ribosómico y, especialmente, las del gen ribosómico 16S, han sido ampliamente aceptadas para la descripción de nuevas especies o taxones más elevados como géneros, familias y órdenes (Kuykendall, 2005).

En los rhizobia, al igual que en todos los procariotas, el *locus* del ADN ribosómico contiene los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S y 23S. El ADN ribosómico 5S y 23S pueden ser utilizados para establecer relaciones filogenéticas, pero el pequeño tamaño del primero, unos 120 pares de bases, limita la información que puede obtenerse de él, y la gran longitud del segundo, unos 3000 pares de bases, hace que resulte de difícil manejo. Por lo tanto, el más utilizado es el ADN ribosómico 16S (gen *rrs*) (Olsen *et al.*, 1986; Woese *et al.*, 1984; Woese, 1987), de aproximadamente 1500 nucleótidos, que

además de tener regiones conservadas que permiten el estudio de las relaciones entre taxones distantes, contiene regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies (Ludwig y Schleifer, 1994; Roselló-Mora y Amann, 2000; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Estos genes están separados por dos regiones intergénicas, ITS1, situada entre los genes ribosómico 16S y el 23S, e ITS2, situado entre los genes ribosómicos 23S y el 5S, que exhiben una gran variabilidad y pueden ser utilizadas para caracterizar grupos taxonómicos a nivel intraespecífico. No obstante, el más utilizado es el ITS1, que en el caso de los rhizobia de crecimiento rápido puede alcanzar los 1200 pares de bases y se ha demostrado muy útil tanto para la delimitación de especies como para estudios de variabilidad intraespecífica (Laguerre *et al.*, 1996; Lebuhn *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2006).

Además de éstos, otros genes con funciones conservadas han sido propuestos para establecer relaciones filogenéticas entre diferentes grupos de bacterias y refinar las filogenias construidas con el *rrs* (Feil *et al.*, 2004). Muchos de ellos han sido empleados para el estudio de filogenia de rhizobia incluidos en las α -proteobacterias, este es el caso de los genes *recA*, que codifican parte del sistema de recombinación homóloga y reparación del ADN (Eisen, 1995; Gaunt *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005b), y *atpD*, que codifica la subunidad β de la ATP sintetasa de membrana, la cual es esencial para la producción de energía (Gaunt *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 1998; Vinuesa *et al.*, 2005b).

Este tipo de genes, denominados *housekeeping*, por estar implicados en procesos esenciales para el mantenimiento de la vida de la célula se han aplicado a diferentes géneros de rhizobia y en los últimos años se han llevado a cabo estudios concatenando estos genes (MLSA o MLST) lo que permite mejorar el análisis filogenético y conseguir una mayor estabilidad en las posiciones filogenéticas de las especies (Martens *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2009; van Berkum *et al.*, 2006).

1.4.2. Biodiversidad de los rhizobia

A pesar de que la secuenciación y la hibridación de DNA son las técnicas básicas para la diferenciación de géneros y especies en los rhizobia, ninguna de las dos puede ser aplicada a amplias poblaciones y por lo tanto no son útiles para el análisis de la biodiversidad de estas bacterias. Para ello se utilizan técnicas rápidas basadas generalmente en la amplificación de ADN y posterior electroforesis directa de los amplicones o bien después de ser cortados con enzimas de restricción. La amplificación de ADN se lleva a cabo mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), técnica desarrollada por Kary Mullis en los años 80 (Mullis y Faloona, 1987). Se trata de una técnica *in vitro* que, empleando *Taq* polimerasa (enzima resistente al calor que promueve la síntesis de ADN), oligonucleótidos o

primers complementarios de los extremos de la región que se quiere amplificar y nucleótidos libres de todas las bases nitrogenadas, permite, tras una serie de ciclos en los que se varía la temperatura para desnaturalización de las hebras de ADN, la unión de cebadores y la elongación de las nuevas cadenas, obtener millares de copias del fragmento de ADN deseado.

Dentro de las técnicas basadas en la electroforesis directa de los amplicones, los perfiles de TP-RAPD (Two Primers-RAPD), constituyen una técnica en la que, a diferencia de los RAPD convencionales, se realiza una amplificación a partir de dos primers complementarios de regiones altamente conservadas del ADN ribosómico 16S (Iguar *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2002a). Los perfiles obtenidos son característicos de subespecie y no dependientes de cepa como ocurre con otras técnicas mediante las cuáles se obtienen al azar bandas de ADN que son dependientes de cepa y por lo tanto varían dentro de una misma especie, como sucede en el caso de los RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990), AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) (Welsh y McClelland, 1990) y DAF (DNA Amplified Fingerprinting) (Bassam *et al.*, 1992; Caetano-Anolles *et al.*, 1991).

Tanto los perfiles de TP-RAPD como los perfiles de RAPD se han utilizado para analizar la biodiversidad de los rhizobia (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; García-Fraile *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2007; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009b; Valverde *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 2010), aunque los TP-RAPD son más útiles que los RAPD en estudios taxonómicos y, por el contrario, los RAPD son más útiles en estudios de biodiversidad ya que presentan una variabilidad mucho más alta.

Cuando los productos de PCR son digeridos con enzimas de restricción se habla de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Doignon-Bourcier *et al.*, 2000; Laguerre *et al.*, 1994). Los análisis mediante RFLP de genes que codifican diferentes zonas del ARN ribosómico constituyen un procedimiento útil para la identificación y clasificación de bacterias así como una determinación preliminar de relaciones sistemáticas (Fulchieri *et al.*, 2001; Gürtler *et al.*, 1991; Terefework *et al.*, 1998). Esta técnica ha sido muy utilizada en rhizobia tanto de crecimiento rápido como lento y se ha aplicado a la caracterización de rhizobia que nodulan *Phaseolus* (Aguilar *et al.*, 2004; Diouf *et al.*, 2001; Laguerre *et al.*, 1994; Mhamdi *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003)

1.4.3. Características simbióticas de los rhizobia

La caracterización simbiótica consiste en el análisis de la infectividad y de la efectividad de los rhizobia, así como el estudio de marcadores genéticos relacionados con la simbiosis, como los genes de nodulación (*nod*) o de fijación (*nif*) (Eardly *et al.*, 1992; Haukka

et al., 1998; Iglesias *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005b; Ueda *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2003). Debido a que estos genes simbióticos no codifican para funciones básicas de la bacteria como la traducción, transcripción, regulación o metabolismo primario, forman parte del paquete genético flexible, que puede ganarse o perderse por transferencia horizontal, así, las filogenias construidas con genes simbióticos son incongruentes con las construidas mediante secuencias de genes estructurales. Sin embargo, aportan valiosa información sobre el rango de hospedador de los rhizobia (Laguerre *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2003), las relaciones con otras bacterias fijadoras, puesto que se trata de un carácter ancestral de amplio espectro filogenético (Doberet *et al.*, 1994; Young, 1992), la coevolución rhizobia-leguminosa (Álvarez-Martínez, 2007), así como sobre su origen geográfico. Además, el gen *nodC* se ha propuesto para la delimitación de biovariedades dentro de especies que nodulan alubia y otras leguminosas (Laguerre *et al.*, 2001; Mnasri *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2007).

Los genes simbióticos están incluidos en islas simbióticas (Sullivan *et al.*, 2002) o en plásmidos y combinaciones de todos ellos (Sørensen *et al.*, 2005) y se ha demostrado que muchos de estos elementos genéticos se transmiten frecuentemente por transferencia horizontal mediante mecanismos de conjugación, transducción o transformación. El proceso de transferencia horizontal de genes está unido a la presencia de elementos genéticos especiales móviles llamados elementos transponibles. Los elementos genéticos móviles incluyen secuencias de inserción, transposones, integrones, bacteriófagos, islas genómicas (como las de patogenicidad (Hacker *et al.*, 1997) o de simbiosis (Sullivan *et al.*, 2002)), plásmidos y combinaciones de todos ellos (Sørensen *et al.*, 2005).

En los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (*Ensifer*) y en algunas especies del género *Mesorhizobium*, se ha observado la presencia de plásmidos muy grandes, con tamaños de entre 0,4 Mpb a más de 1 Mpb, en los que se encuentran localizados los genes de nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno, por lo que se denominan “plásmidos simbióticos” o “pSym” (Sessitch *et al.*, 2002). En *Bradyrhizobium* y algunas especies de *Mesorhizobium* (Kaneko *et al.*, 2000; Minamisawa *et al.*, 1998; Sullivan y Ronson, 1998; Sullivan *et al.*, 2002) los genes de simbiosis son cromosómicos y se encuentran agrupados en un fragmento de unas 500 Kpb (Gottfert *et al.*, 2001), denominado “isla simbiótica”.

La transferencia de genes simbióticos a bacterias no simbióticas que se encuentran en el rizosfera, puede dar origen a nuevas cepas capaces de nodular (Ochman y Morán, 2001; Sullivan *et al.*, 1995), lo cual podría explicar la gran diversidad en el fondo genético de las especies con capacidad para nodular leguminosas y el hecho de que bacterias próximas a aquellas que nodulan no tengan esta capacidad (Brom *et al.*, 2000). Así, en los últimos años se ha descrito la existencia de cepas formadoras de nódulos en grupos de bacterias tradicionalmente considerados como no-rhizobia dentro de los géneros *Blastobacter*, *Devosia*,

Methylobacterium, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum*, de la clase α -*Proteobacteria*, además de los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* pertenecientes a la clase β -*Proteobacteria*. Todo esto puede hacernos suponer que irán descubriéndose nuevas especies que establecen interacciones simbióticas con las leguminosas para llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

1.4. 4. Los rhizobia que forman simbiosis con *Phaseolus vulgaris*

El género *Phaseolus* incluye algunas de las leguminosas más promiscuas en lo que se refiere al elevado número de rhizobia con los que son capaces de establecer simbiosis efectivas. Esta capacidad de ser noduladas por una elevada variedad de bacterias se ha relacionado con el espectro de inductores de genes de nodulación que secretan, considerándose *P. vulgaris* como una de las leguminosas que libera mayor cantidad y variedad de flavonoides, exudados tanto por la raíz como por la semilla (Morón *et al.*, 2006). Existen numerosos estudios sobre la diversidad de bacterias que nodulan algunas de las especies englobadas en el género *Phaseolus* (Andrade *et al.*, 2002; Anyango *et al.*, 1995; Bernal y Graham, 2001; Beyene *et al.*, 2004; Hana *et al.*, 2005; Herrera-Cervera *et al.*, 1999; Kaschuk *et al.*, 2006; Moawad *et al.*, 2004; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 2001; García-Fraile *et al.*, 2010). Aunque se ha descrito la nodulación de algunas especies de *Phaseolus* en América por microorganismos del género *Bradyrhizobium* (Ormeño *et al.*, 2006), los que nodulan *P. vulgaris* de un modo eficiente se incluyen dentro de la familia *Rhizobiaceae* en los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (*Ensifer*).



Figura 6. Nódulos formados en *Phaseolus vulgaris* por diferentes grupos de rhizobia: A) *Rhizobium leguminosarum*. B) *Ensifer melliloti*

Los principales endosimbiontes americanos de *P. vulgaris* son *Rhizobium etli*, *R. phaseoli* y *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) aunque en México se ha encontrado *Rhizobium gallicum* (Silva *et al.*, 2003), una especie descrita inicialmente en Europa junto con *R. giardinii* que contiene dos variedades, de las cuáles una no forma nódulos efectivos en judía (Amarger *et al.*, 1997). *R. leguminosarum*, que es la especie tipo del género *Rhizobium*, ha sido recientemente revisada (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) y contiene biovariedades que nodulan diferentes leguminosas; una de

ellas denominada phaseoli, es capaz de formar nódulos muy efectivos en alubia en suelos europeos (García-Fraile *et al.*, 2010). Otro endosimbionte de *P. vulgaris* aislado en Europa es *R. lusitanum* (Valverde *et al.*, 2006). En cuanto al género *Ensifer* (anteriormente denominado *Sinorhizobium*) contiene dos especies capaces de formar nódulos efectivos en alubia, *S. meliloti* y *S. fredii* (Mhamdi *et al.*, 2002; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2009). En ambos casos contienen una biovariedad denominada mediterránea que nodula alubia en Europa y África, incluyendo la península ibérica y las Islas Canarias (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2009).

1.4.5. Los rhizobia como inoculantes de leguminosas

Uno de los objetivos principales del análisis de poblaciones de rhizobia que nodulan diferentes leguminosas en distintos suelos y localizaciones geográficas es la selección de cepas autóctonas para el diseño de biofertilizantes fijadores de nitrógeno en simbiosis con leguminosas que permitan la reducción de la utilización de fertilizantes nitrogenados químicos y, por lo tanto, el desarrollo de una agricultura productiva más respetuosa con el medio ambiente y con la salud humana y animal.

El planteamiento básico para la selección de cepas de alta efectividad nitro fijadora consta de dos etapas (Sessitsch *et al.* 2002). La primera es optimizar la interacción entre el genotipo de la leguminosa (G_l) y el genotipo de los *rhizobia* (G_r). La segunda consiste en optimizar la interacción entre las cepas seleccionadas en la etapa anterior (G^2), y el medio ambiente en el que va a producirse el cultivo (E). El primer paso puede ser evaluado en condiciones controladas sobre un sustrato de crecimiento estéril e inerte, regado con una solución nutritiva libre de nitrógeno. En estas condiciones se controlan y optimizan los parámetros ambientales esenciales para el desarrollo de las plantas, nodulación, y fijación de nitrógeno, por lo que el crecimiento acaba dependiendo exclusivamente de la actuación del conjunto de genes huésped – bacteria disponible para la fijación de nitrógeno. El segundo paso consiste en seleccionar entre las cepas preseleccionadas según el paso anterior, aquellas capaces de proporcionar mejor fijación de N en las condiciones edafoclimáticas de la zona de cultivo elegida. Con frecuencia lo que se analiza es la producción final en condiciones controladas, en macetas rellenas con suelo de la zona de cultivo (microcosmos), aunque posteriormente sea necesaria una validación en campo.

De cara a la elaboración de biofertilizantes, es necesario conocer exactamente las bacterias que vayan a formar parte de los mismos, ya que unas especies microbianas son beneficiosas para las plantas y otras perjudiciales, y además se ha descubierto que bacterias consideradas no simbióticas hasta hace muy poco tiempo pueden nodular y fijar nitrógeno en simbiosis con algunas leguminosas (Velázquez *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2006). El proceso

de identificación de bacterias del suelo es muy complejo, pero actualmente existen varias técnicas moleculares para llegar a la identificación precisa de las cepas bacterianas. La metodología a utilizar parte de un cierto número de cepas aisladas en una determinada área geográfica y obtiene en primer lugar para todos los aislados, los perfiles de bandas de DNA mediante PCR utilizando dos *primers* universales que amplifican el 16S rDNA y una serie de bandas adicionales, técnica que ha recibido el nombre de TP-RAPD *fingerprinting* (Rivas *et al.* 2001). Los perfiles obtenidos no son cepa-dependientes, y permiten agrupar las cepas a niveles taxonómicos aceptados actualmente como son la especie y subespecie; en consecuencia estos perfiles permiten seleccionar aislados para llevar a cabo otras técnicas moleculares más complejas.

El gen ribosómico 16S es universalmente utilizado para clasificar las bacterias, sin embargo se ha demostrado que en el caso del género *Rhizobium* la secuencia de este gen no es capaz de discriminar entre especies muy próximas que nodulan *Phaseolus* (Valverde *et al.*, 2006). Debido a esto se han secuenciado otras regiones del genoma bacteriano que muestran alta variabilidad genética a lo largo de la evolución y que han demostrado una gran utilidad para diferenciar entre especies muy próximas, son los genes denominados “housekeeping”. Dentro de los rhizobia se han utilizado fundamentalmente los genes *recA* y *atpD* (Valverde *et al.*, 2006), que son los que se utilizarán en la tesis.

Además de identificar correctamente las cepas aisladas a partir de nódulos, es necesario conocer la biovariedad a la que pertenecen pues aunque la alubia es un hospedador muy promiscuo, las cepas que mejor nodulan esta leguminosa pertenecen a la biovariedad phaseoli. Para conocer la biovariedad a la que pertenecen las cepas es necesario secuenciar un gen simbiótico denominado *nodC*, que ha sido descrito como marcador filogenético de promiscuidad para el hospedador y se ha propuesto su uso para la delimitación de biovariedades dentro de especies que nodulan alubia y otras leguminosas (Laguerre *et al.*, 2001; Mnasri *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2007).

Una vez conocidas estas características, para diseñar un biofertilizante eficaz es necesario analizar la capacidad de las cepas de rhizobia para formar nódulos y para fijar nitrógeno en simbiosis en experimentos llevados a cabo en condiciones axénicas, en primer lugar, para posteriormente analizar su efecto en condiciones naturales.

Tabla 1A. Especies descritas dentro de los rhizobia clásicos

Clase I. α Proteobacteria. Orden Hyphomicrobiales		
Especie de rhizobia	Hospedador de origen	Referencia
Familia Rhizobiaceae, Género Rhizobium		
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2009a)
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Medicago</i>	(García-Fraile <i>et al.</i> , 2007)
<i>R. daejeonense</i>	*	(Quan <i>et al.</i> , 2005)
<i>R. elii</i>	<i>Phaseolus</i>	(Segovia <i>et al.</i> , 1993)
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia</i>	(Tian <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. galegae</i>	<i>Galegae</i>	(Lindstrom, 1989)
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus</i>	(Amarger <i>et al.</i> , 1997)
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus</i>	(Amarger <i>et al.</i> , 1997)
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1997)
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2002)
<i>R. larrymoorei</i>	*	(Bouzar y Jones, 2001; Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2003)
<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus</i>	(Valverde <i>et al.</i> , 2006)
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizzia, Kummerowia, Dalbergia</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	(Gu <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago</i>	(Van Berkum <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. multihospitium</i>	<i>Robinia, Halimodendron</i>	(Han <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. oryzae</i>	<i>Phaseolus, Glycine</i>	(Peng <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum, Vicia</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. radiobacter</i>	*	(Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. rhizogenes</i>	<i>Phaseolus</i>	(Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. rubi</i>	*	(Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>	(Squartini <i>et al.</i> , 2002)
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella</i>	(Hou <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i>	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
<i>R. undicola</i>	<i>Sesbania</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1998a; Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. vitis</i>	*	(Ophel y Kerr, 1990; Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>	(Tan <i>et al.</i> , 2001b)
Familia Rhizobiaceae, Género Ensifer (antes Sinorhizobium)		
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia</i>	(Nick <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1988; Scholla y Elkan, 1984)
<i>E. garamanticus</i>	Varias leguminosas africanas	(Merabet <i>et al.</i> , 2010)
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia</i>	(Nick <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003)
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003)
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago</i>	(Rome <i>et al.</i> , 1996; Young, 2003)
<i>E. numidicus</i>	Varias leguminosas africanas	(Merabet <i>et al.</i> , 2010)
<i>E. sahelii</i>	<i>Acacia</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003)
<i>E. terangae</i>	<i>Acacia</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003)
<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1988; Young, 2003)
<i>E. morelense</i>	*	(Wang <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003)
<i>E. adhaerens</i>	*	(Casida, 1982)
Familia Rhizobiaceae, Género Mesorhizobium		
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizzia</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2010)
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1999b)
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula</i>	(Nandasena <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis</i>	(Velázquez <i>et al.</i> , 2001a)
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer</i>	(Jarvis <i>et al.</i> , 1997; Nour <i>et al.</i> , 1994)
<i>M. gobiense</i>	<i>Leguminosas silvestres chinas</i>	(Han <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1991; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>	(Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer</i>	(Jarvis <i>et al.</i> , 1997; Nour <i>et al.</i> , 1994)
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis</i>	(Vidal <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula</i>	(Nandasena <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia</i>	(De Lajudie <i>et al.</i> , 1998a)
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2004)

Clase I. α-Proteobacteria. Orden <i>Hyphomicrobiales</i>		
Especie de rizobia	Hospedador de origen	Referencia
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2009b)
<i>M. tarimense</i>	<i>Leguminosas silvestres chinas</i>	(Han <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. thiogangelicum</i>	*	(Ghosh y Roy, 2006)
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
Familia <i>Nitrobacteriaceae</i>, Género <i>Bradyrhizobium</i>		
Especie de rizobia	Hospedador de origen	Referencia
<i>B. betae</i>	*	(Rivas <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i>	(Vinueza <i>et al.</i> , 2005a)
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i>	(Kuykendall <i>et al.</i> , 1993)
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada</i>	(Islam <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>	(Jordan, 1982)
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009a)
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i>	(Xu <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009a)
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	(Yao <i>et al.</i> , 2002)

Tabla 1B. Especies que nodulan leguminosas y no pertenecen a los rizobia clásicos

Clase I. α-Proteobacteria. Orden <i>Hyphomicrobiales</i>		
Especie	Hospedador de origen	Referencia
Familia <i>Phyllobacteriaceae</i>, Género <i>Phyllobacterium</i>		
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	(Valverde <i>et al.</i> , 2005)
Familia <i>Nitrobacteriaceae</i>, Género <i>Blastobacter</i>		
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	(Van Berkum y Eardly, 2002)
Familia <i>Hyphomicrobiaceae</i>, Género <i>Hyphomicrobium</i>		
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	(Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)
Familia <i>Hyphomicrobiaceae</i>, Género <i>Devosia</i>		
<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	(Rivas <i>et al.</i> , 2002b; Rivas <i>et al.</i> , 2003)
Familia <i>Brucellaceae</i>, Género <i>Ochrobactrum</i>		
<i>O. lupini</i>	<i>Lupinus</i>	(Trujillo <i>et al.</i> , 2005)
<i>O. cyllisi</i>	<i>Cytisus</i>	(Zurdo-Piñero <i>et al.</i> , 2007)
Familia <i>Methylobacteriaceae</i>, Género <i>Methylobacterium</i>		
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i>	(Sy <i>et al.</i> , 2001)
Clase II. β-Proteobacteria. Orden <i>Burkholderiales</i>		
Familia <i>Burkholderiaceae</i>, Género <i>Burkholderia</i>		
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa ssp.</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus carnosa</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
Familia <i>Burkholderiaceae</i>, Género <i>Cupriavidus</i>		
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp.</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2001b; Vandamme y Coenye, 2004)

* Especies de rizobia "clásicos" en las que no se ha comprobado la capacidad para nodular leguminosa

2. OBJETIVOS

El **objetivo global** planteado en esta tesis es el aislamiento, caracterización y selección de rizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana el que nos permita avanzar hacia una fertilización racional en el cultivo de esta leguminosa mediante la selección de cepas autóctonas de *rhizobia* de elevada eficiencia en la fijación de nitrógeno, para fabricar con ellas biofertilizantes.

Objetivos concretos:

1. Obtener una colección de cepas de simbiontes específicos de habichuela roja autóctonos de agrosistemas de montaña en República Dominicana, mediante muestreo directo de las plantas y aislamiento a partir de los nódulos presentes en las raíces de *P. vulgaris* creciendo en diferentes fincas de cultivo.
2. Caracterizar los simbiontes autóctonos aislados en los nódulos radiculares, mediante técnicas moleculares y fenotípicas.
3. Preseleccionar las cepas de simbiontes autóctonos que presenten una mayor eficiencia de nitro fijación en un medio hidropónico y libre de nitrógeno.
4. Hacer una segunda selección entre las cepas preseleccionadas en medio hidropónico, sobre suelo de las zonas de producción y en condiciones de microcosmos (en maceta) para llegar a recomendar una o varias cepas para fabricar biofertilizantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCEDENCIA DE LOS NÓDULOS

Los nódulos fueron extraídos de plantaciones de habichuela en estado fenológico de floración en los municipios de Constanza, Rancho Arriba y Hondo Valle; perteneciente a las provincias de la Vega, Ocoa y Elías Piña, respectivamente, de la República Dominicana (Figura 7). El aislamiento se realizó en plantas de habichuela roja variedad José Beta, que presenta generalmente una buena nodulación. Por cada parcela se tomaron 15 plantas al azar bien separadas unas de otras y de cada planta se tomaron de 2 a 7 nódulos de aspecto rosado (efectivos) con 1 cm aproximado de raíz a cada lado, para luego ser introducidos en un frasco conteniendo el desecante (cloruro cálcico anhidro cubierto con algodón hidrófilo). En esos frascos permanecieron los nódulos hasta la extracción y cultivo de los microorganismos *in vitro*.

Los frascos fueron debidamente identificados de acuerdo al lugar y número de parcela. Antes de introducir los nódulos en los frascos, éstos fueron lavados cuidadosamente con agua en frascos lavadores y secados con papel de celulosa para eliminar los restos de suelo. Cuando aparecían en una misma planta nódulos de diferentes tamaños se introdujeron en frascos diferentes. Los frascos conteniendo los nódulos durante la recolección en el campo se mantuvieron en la sombra dentro de una nevera portátil hasta su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio los nódulos fueron conservados a 20 grados centígrados, hasta su traslado a León, España.

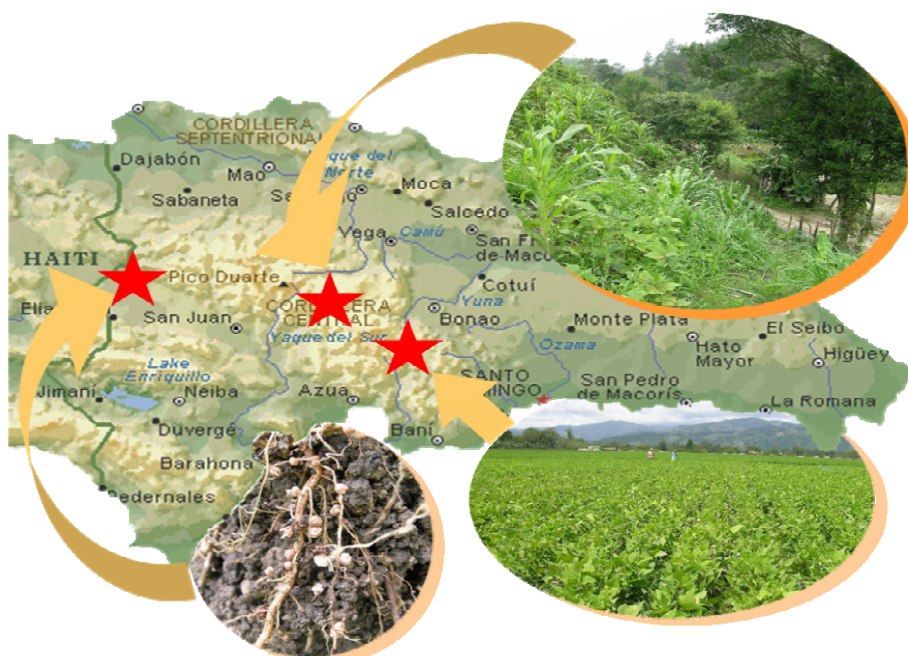


Figura 7. Zonas de muestreo de los nódulos en el cultivo de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.)

3.1.1. Características de los suelos en los que se aislaron las cepas

Tabla 2. Características químicas de los suelos utilizados para realizar los aislamientos

Procedencia de las muestras				%	meq/100 mL			ppm	%
Código muestras	Sección o paraje	Provincia	pH	Nitrógeno Total	Ca	Mg	K	P	Materia Orgánica
RI	El Río	La Vega	5,9	0,28	5,48	1,36	0,59	34	3,49
PA	Palero	La Vega	7,0	0,29	27,93	14,40	2,46	180	4,60
AR	Arenazo	La Vega	6,3	0,15	18,95	8,14	1,08	137	2,85
LQ	Los Quemados	San José de Ocoa	7,7	0,28	24,97	1,25	0,82	154	4,44
AC	Arroyo Caña	San José de Ocoa	5,2	0,22	8,32	2,47	0,67	50	2,22
SC	Sabana de Chen	Elías Piña	8,0	0,22	42,40	2,20	0,50	11	3,49
LF	La Fuente	Elías Piña	8,0	0,20	45,14	2,38	0,63	10	2,54
CS	Cañada Seca	La Vega	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no determinado

3.1.2. Aislamiento de cepas de rhizobia a partir de nódulos de habichuela

Los nódulos se esterilizaron en superficie sumergiéndolos en una solución de HgCl_2 al 1,0% durante 4,5-6,0 minutos. Después, en condiciones asépticas, se lavaron diez veces con agua estéril para eliminar los restos de HgCl_2 (Figura 8).

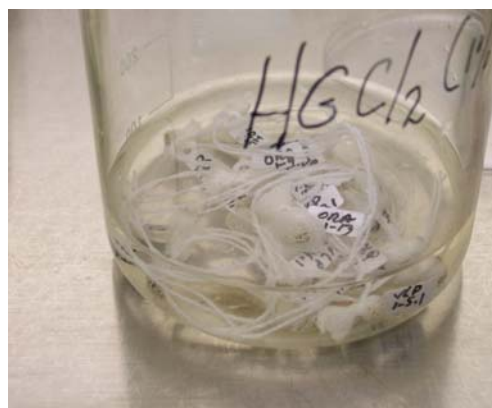


Figura 8. Proceso de esterilización de los nódulos en cloruro de mercurio (HgCl_2)

Posteriormente se trituraron uno a uno con ayuda de una varilla de vidrio estéril y se sembraron en placas con medio de cultivo YMA (Vincent, 1970) (Tabla 3). Las placas se incubaron a 28°C durante una semana, durante este tiempo se produjo el crecimiento de bacterias procedentes del interior del nódulo. A partir de las colonias formadas por dichas bacterias en las placas se realizaron aislamientos por agotamiento en estría para finalmente obtener cultivos puros que fueron crecidos en el mismo medio y a la misma temperatura.

En el estudio se utilizaron también cepas tipo de diversas especies de *Rhizobium* procedentes de colecciones de cultivo que se utilizaron como referencia (Tabla 4).

Tabla 3. Composición del medio YMA

K ₂ HPO ₄ (Fluka®)	0,5 g
MgSO ₄ (Fluka®)	0,2 g
NaCl (Fluka®)	0,1 g
Manitol (Fluka®)	10,0 g
Extracto de levadura (Difco®)	0,2 g
Agar (Conda®)	15,0 g
Agua destilada, c.s.p.	1 L

Tabla 4. Cepas en el estudio utilizadas como referencia

ESPECIE	CEPA	PLANTA HOSPEDADORA
<i>R.rhizogenes</i>	ATCC 11325 ^T	<i>Phaseolus</i>
<i>R.lusitanum</i>	P1-7 ^T	<i>Phaseolus</i>
<i>R.tropici</i> II B	CIAT 899 ^T	<i>Phaseolus</i>
<i>R. etli</i>	CFN42 ^T	<i>Phaseolus</i>
<i>R.phaseoli</i>	ATCC 14482 ^T	<i>Phaseolus</i>
<i>R. giardini</i>	H152 ^T	<i>Phaseolus</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	USDA 2370 ^T	<i>Pisum</i>
<i>R. pisi</i>	DSM 30132 ^T	<i>Pisum</i>
<i>R. miluonense</i>	CCBAU 41251	<i>Lespedeza</i>
<i>R. fabae</i>	CCBAU 33202	<i>Vicia</i>
<i>R. multihospitium</i>	CCBAU 83401	<i>Robinia</i>

3.1.3. Mantenimiento y conservación de las cepas aisladas

El mantenimiento de las cepas se llevó a cabo en placas de medio YMA a 4 °C, realizando resiembras mensualmente.

La conservación se realizó por congelación a – 84°C, utilizando como agente crioprotector una solución acuosa de glicerol al 50 %, la que se repartió en criotubos y luego se esterilizó en autoclave. Posteriormente, se prepararon suspensiones celulares de cada uno de los aislados en medio de cultivo YMB estéril, a partir de cultivos en YMA durante 5-7 días a 28 °C. Cada una de las cepas se preservó en dos criotubos, añadiendo 500 µL de la suspensión por tubo.

3.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

3.2.1. Extracción de DNA para PCR y secuenciación

Para extraer el DNA las cepas se inocularon en placas con medio TY (Beringer, 1974) y se incubaron durante 24-48h a 28°C. A continuación se resuspendieron las células en 200µL de agua estéril. Se centrifugó durante 15s a 10000 rpm. Las células se resuspendieron en 200µL de sarcosyl al 1%, se centrifugó a 14000 rpm durante 4min y se desechó el sobrenadante (Tabla 5).

Tabla 5. Proceso de extracción de DNA en *Rhizobium*

Paso	ETAPA - Observaciones	Reactivos	Tiempo – Temperatura
1	SIEMBRA DE RHIZOBIUM Siembra del <i>Rhizobium</i> tras congelación en medio YMA e incubación en estufa	Medio YMA	2 días / 28°C
2	SIEMBRA DE RHIZOBIUM Siembra de colonia aislada de <i>Rhizobium</i> desde YMA a TY	Medio TY	2 días / 28°C
3	PASO DE RHIZOBIUM A EPPENDORF Paso de colonia a Eppendorf y congelación a -84°C (conservación) o suspensión en agua milliQ 200µL	Agua milliQ	Indefinido -84°C (conservación)
4	SPIN: Centrifugado rápido a 12000 rpm. Después desechar el agua		20 – 30 seg
5	LAVADO CON SARCOSYL Primer lavado de la muestra con 200µL de sarcosyl 0.1% (preparado reciente, 3 días, y autoclavado)	Sarcosyl 0.1%	
6	CENTRIFUGADO 12000 rpm Desechar después el sarcosyl		4 min
7	TRATAMIENTO NaOH Termoblock o Baño María con el NaOH y luego añadir 300µL de agua milliQ	NaOH 0.05 M Agua milliQ	4 min / 100°C
8	CENTRIFUGADO 12000 rpm		3 min
9	RECOGER SOBRENADANTE (aprox: 200 – 300 µL) AÑADIR LA MISMA CANTIDAD DE MEZCLA Fenol/Cloroformo/Isoamílico (homogeneizar)	F / C / I 25:24:1	
10	CENTRIFUGADO FRÍO 12000 rpm		3 min / 4°C
11	AÑADIR AL SOBRENADANTE (200 µL) IGUAL CANTIDAD DE Cloroformo/Isoamílico	C / I 24 : 1	
12	CENTRIFUGADO FRÍO 12000 rpm		3 min / 4°C
13	MEZCLA CON ACETATO Na Y ETANOL Por cada 100µL de DNA se añaden 7µL de Acetato Na y 4 volúmenes de Etanol absoluto frío	Acetato Na Etanol Abs. (frío)	
14	ALMACENAMIENTO EN FRÍO Guardar el Eppendorf en el congelador		12 h / -20°C / 2 h / -80°C
15	CENTRIFUGADO FRÍO 13000 rpm		20 min / 4°C
16	SECADO Retirar previamente el sobrenadante con pipeta y emplear un SpeedVac® o dejarlo secar en estufa al aire		> 2 h / 37°C
17	RESUSPENSIÓN Resuspender la muestra seca con agua milliQ 200µL en estufa y estará después listo para emplear o congelar indefinidamente.	Agua milliQ	15 min / 42°C

La extracción del DNA se llevó a cabo añadiendo a las células 100µL de NaOH 0.05M, que se calentaron a 100°C durante 4 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 300µL de agua milliQ estéril, se homogeneizó la mezcla de forma suave y se centrifugó a 12000 rpm durante 3min para eliminar los restos celulares.

Después de la centrifugación, se trasvasó el sobrenadante a un segundo tubo Eppendorf de 1.5 mL , se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1), se homogeneizó con micropipeta durante 10s y se centrifugó a 12000 rpm durante 3min.

La fase acuosa se trasvasó a un tubo nuevo y se adicionó un volumen equivalente de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó nuevamente durante 10s y se centrifugó durante 3min a 12000 rpm.

Se trasvasó una vez más la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadieron 0.07 volúmenes de acetato de sodio pH 7 (Amresco, USA) y 4 volúmenes de etanol absoluto (Merck). Se agitó por inmersión y se mantuvo a -20°C durante 12h.

Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 20min, se eliminó el sobrenadante y las muestras se secaron en SpeedVac durante 5min. Se agregaron 200µL de

agua milliQ estéril a cada uno de los tubos y se calentaron a 42°C durante 15 min para disolver el DNA.

3.2.2. Análisis de los perfiles de TP-RAPD

Con el DNA extraído de cada una de las cepas aisladas y el de las cepas de referencia se llevaron a cabo las PCR utilizando la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla 6. Para llevar a cabo la reacción se empleó la enzima AmpliTaqGold® de Applied Biosystems (USA).

Tabla 6. Reactivos utilizados en la PCR para la obtención de los perfiles TP-RAPD y M13-RAPD

TP-RAPD	µl/reacción	M13-RAPD	µl/reacción
Tampón 10X	2,5	Tampón 10X	2,5
dNTP 10 mM	0,5	dNTP 10 mM	0,5
MgCl ₂ 25 mM	5,0	MgCl ₂ 25 mM	5,0
Primer R 20 µM	2,0	Primer M13 20 µM	2,0
Primer F 20 µM	2,0		
BSA 0,1 %	1,0	BSA 0,1 %	1,0
Agua milliQ estéril	9,1	Agua milliQ estéril	11,1
Taq polimerasa 5U/µl	0,4	Taq polimerasa 5U/µl	0,4
DNA	2,5	DNA	2,5
Volumen final	25	Volumen final	25

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo GeneAmp® PCR System 9700 PE (Applied Biosystems, USA), utilizando los programas y cebadores específicos en cada caso que se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Condiciones de la PCR

Perfil	TP-RAPD	
Predesnaturalización	95°C – 10'	
35 ciclos	Desnaturalización	94°C – 1'
	Anillamiento	50°C – 1'
	Extensión	72°C – 2'
Extensión final	72°C – 7'	
Almacenamiento	4°C - ∞	

Tabla 8. Cebadores utilizados

Perfil	Cebador	Secuencia	Referencia
TP-RAPD	1522R	5'-AAGGAGGTGATCCANCRCA-3'	Rivas <i>et al.</i> , 2001
	879F	5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA-3'	Rivas <i>et al.</i> , 2002a

Una vez concluida la PCR, las muestras se mantuvieron a 4°C refrigeradas hasta su empleo. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel horizontal de agarosa 1,5% utilizando el tampón TBE. A 25 µl de muestra se añadió un volumen de 8 µl de frente de carga de electroforesis, y se incluyó el patrón VI de Roche como marcador de peso molecular (12 µl más 8 µl de frente de carga). La electroforesis se llevó a cabo a 6 V cm⁻¹ durante 2 h. El

gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 20 minutos y se fotografió utilizando el equipo GelDoc 2000 System de Biorad® (USA).

3.2.3. Secuenciación de DNA

La amplificación de los genes 16S rRNA, *recA*, *atpD* y *nodC* se llevó a cabo mediante PCR con los respectivos cebadores utilizando la mezcla que se especifica en la Tabla 9. La reacción de la PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems® (USA) utilizando los programas y cebadores señalados en cada caso (Tablas 10 y 11). Para ello se empleó la enzima AmpliTaqGold® de Applied Biosystems (USA).

Tabla 9. Reactivos utilizados en la amplificación de DNA por PCR

Reactivo	$\mu\text{l}/\text{reacción}$
Tampón 10X	5,0
dNTP 10 mM	1,0
MgCl ₂ 25 mM	4,0
Primer R 20 μM	3,0
Primer F 20 μM	3,0
BSA 0,1 %	2,0
Agua milliQ estéril	26,8
Taq polimerasa 5U/ μl	0,3
DNA	5,0
Volumen final	50,0

Tabla 10. Programas utilizados para la amplificación de los genes ribosómico 16s rRNA, *nodC*, *atpD* y *recA* por PCR

Perfil	16S	<i>atpD</i> , <i>recA</i> y <i>nodC</i>	
Predesnaturalización	95°C – 10'		
35 ciclos	Desnaturalización	94°C – 1'	
	Anillamiento	54°C – 1' 30"	54°C - 1'
	Extensión	72°C – 2'	72°C – 1'
Extensión final	72°C – 7'		
Almacenamiento	4°C - ∞		

Tabla 11. Cebadores empleados para la amplificación de los genes 16s rRNA, *nodC*, *atpD* y *recA* por PCR

Gen	Cebadores	Secuencia	Referencia
16S rDNA	R 1522R	5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'	Rivas <i>et al.</i> , 2001
	F 27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	F FGPS 1490	5'-TGCGGCTGGATCACCTCCCTT-3'	
<i>nodC</i>	R <i>nodCl</i>	5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3'	Laguerre <i>et al.</i> , 2001
	F <i>nodCF</i>	5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3'	
<i>atpD</i>	R <i>atpD-Rh-3R</i>	5'-GCCGACACTTCCGAACCGCCTG-3'	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
	F <i>atpD-Rh-1F</i>	5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT-3'	
<i>recA</i>	R <i>recA-Rh-3R</i>	5'-TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT-3'	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
	F <i>recA-Rh1F</i>	5'-CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA-3'	

A los 50 μl del producto de PCR se les añadieron 16 μL del frente de carga y fueron sometidos a electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1,0% en tampón TBE. La electroforesis se realizó a 6 V cm^{-1} durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, el gel fue sumergido en bromuro de etidio en solución $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 20 minutos. Con un bisturí estéril fueron cortadas las bandas correspondientes y purificadas utilizando microcolumnas de extracción Ultrafree®-DA (Millipore, USA). Se centrifugaron a 5000g durante 13 minutos. El filtrado fue trasvasado a un tubo eppendorf y se le añadieron 0.07 volúmenes de acetato

sódico 3 M pH 7 (Fluka, USA) y 4 volúmenes de etanol absoluto (Merck), manteniéndose a -20°C durante 12 h.

Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y las muestras se secaron en estufa a 37°C durante 2 h, se agregó un volumen de 5 µl de agua milliQ estéril por cada cebador de secuenciación y se calentó a 42°C durante 15 minutos para disolver el DNA. Las reacciones de secuenciación se prepararon utilizando 5 µl de la solución de DNA y 2 µl de cebador a concentración 2 µM (un cebador por cada reacción).

La secuenciación de los genes anteriores fue realizada con los mismos cebadores que para la amplificación, salvo para el gen 16S rDNA, para el cual se usaron los cebadores Z4 (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), X1 (5'-GGCTCAGRAYGAACGCTG-3'), X3 (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3'), X5 (5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGT-3'), X7 (5'-CAAAGGAATTGACGGGGGC-3'), y X11 (5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGT-3') (Rivas *et al.*, 2001).

La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando el sistema automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (USA). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y corregidas manualmente con el programa SeqManII de DNASTAR®.

3.2.4. Análisis filogenético de las secuencias

Las secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el modelo de Kimura (Kimura, 1980) y el método Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

3.3.1. Morfología

El crecimiento, la morfología y la pigmentación de las colonias fueron observadas sobre placas de YMA.

La tinción de Gram se realizó según la modificación de Hucker (Doetsch, 1981). En un portaobjetos se preparó una extensión de la bacteria, desecándola y fijándola a la llama. Posteriormente, se cubrió durante 2 minutos con una solución de cristal violeta (Panreac®, España), lavando después con agua destilada. Esta operación se repitió con una solución de lugol (Panreac®, España) y posteriormente se añadió etanol al 95% hasta su decoloración,

lavando con agua destilada. Finalmente, se tiñó con safranina (Panreac®, España) durante 1 minuto, se lavó y se dejó secar.

La preparación se examinó en un microscopio óptico CTRMIC (Leica®, Alemania) con el objetivo de inmersión en aceite (1000 aumentos).

3.3.2. Fisiología

3.3.2.1. Crecimiento en diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad

El crecimiento a diferentes pH se evaluó inoculando las cepas aisladas y las de referencia en tubos con medio YMA a pH 5, 6, 7 y 8.

La capacidad de crecimiento de los microorganismos en condiciones psicrófilas (4°C) y termófilas (45°C), así como también en temperaturas intermedias de 15 °C y 37°C, se estudió sobre cultivos en YMA.

La tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro sódico se evaluó en medio YMB suplementado con 0,5%, 1%, 1,5%, 2% y 2,5% de NaCl. El crecimiento sin sal se probó en caldo nutritivo (Conda®, España).

En todos los casos, transcurridos 7 días se examinó la presencia de crecimiento.

Tabla 12. Antibióticos y concentraciones empleados

Antibiótico	Cantidad de antibiótico/disco
Ampicilina (Oxoid®)	2µg
Cefuroxima (Oxoid®)	30µg
Ciprofloxacina (Oxoid®)	5µg
Cloxaciclina (Oxoid®)	1µg
Eritromicina (Oxoid®)	2µg
Gentamicina (Oxoid®)	10µg
Neomicina (Oxoid®)	5µg
Oxitetraciclina (Sensi-Disc®)	30µg
Penicilina (Oxoid®)	10U.I.
Polimixina B (Sensi-Disc®)	300U.I.

3.3.2.2. Resistencia natural a antibióticos

La resistencia a antibióticos fue evaluada sobre placas con medio YMA en el que se redujo la proporción de agar de un 2 a un 1,5% para permitir la difusión de los antibióticos. En dichas placas se extendió, con hisopos estériles, una suspensión en agua estéril de 1×10^8 u.f.c. de cada uno de los aislados y cepas de referencia y encima se colocaron en

condiciones asépticas discos conteniendo diferentes tipos y concentraciones de antibióticos (Tabla 12).

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

3.3.2.3. Utilización de Fuentes de Carbono y Nitrógeno

La capacidad de los microorganismos para utilizar diversas fuentes de carbono (Tabla 14) se evaluó en medio Bergensen modificado (sin fuente de carbono) al que se adicionó en cada caso la fuente de carbono correspondiente. El crecimiento utilizando algunos aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla 13) se probó añadiendo en cada caso cada uno de los compuestos a medio Bergensen modificado sin nitrato amónico.

Tabla 13. Composición del medio de Bergensen modificado

Fuente de Carbono o de Carbono y Nitrógeno	7g
K ₂ HPO ₄ (Fluka®)	0,2g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Fluka®)	0,2g
NH ₄ NO ₃ (Fluka®)	0,1g
NaCl (Fluka®)	0,1g
Azul de bromotimol (Sigma®)	0,05g
Solución de vitaminas	1 mL
Solución de elementos traza	1 mL
Agar (Conda®)	20,0g.
Agua destilada, c.s.p.	1l.

La solución de vitaminas se preparó disolviendo los siguientes ingredientes en tampón Na₂HPO₄ 0,05M (pH 7,0):

Riboflavina	20,0mg
Ácido P-amino benzoico	20,0mg
Ácido nicotínico	20,0mg
Biotina	20,0mg
Tiamina-HCl	20,0mg
Piridoxina-HCl	20,0mg
Pantotenato cálcico	20,0mg
Inositol	120,0mg

Las sales con los elementos traza, que se indican a continuación, se dispusieron en agua destilada, el pH de la solución resultante se ajustó a 5,0 y se añadió 1g/L de EDTA.

CaCl ₂ .2H ₂ O	6,6mg
H ₃ BO ₃	145,0mg

FeSO ₄ ·H ₂ O	145,0mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	59,0mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5,0mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4,3mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	108,0mg
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	125,0mg

Todos los componentes del medio se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron en autoclave, con excepción de las soluciones de vitaminas y elementos traza y de la fuente de carbono o de carbono y nitrógeno (Tabla 14), que se añadieron posteriormente esterilizándose por filtración.

Los medios preparados se vertieron en placas Petri y sobre ellas se sembraron los microorganismos procedentes de un cultivo de 2-3 días en YMA. Las placas se incubaron a 28°C durante 3-7 días y se valoraron como positivas las pruebas en las que se constató presencia de crecimiento bacteriano.

Tabla 14. Compuestos utilizados como fuentes de Carbono o de Carbono y Nitrógeno

Fuentes de carbono			
Azúcares		Poliálcoholes	Ácidos Orgánicos
Sacarosa	Melobiosa	Inositol	Glucuronato sódico
Sorbosa	Melecitosa	Donitol	Piruvato sódico
Galactosa	Manosa	Meso-eritritol	Gluconato sódico
Rafinosa	Celobiosa	Xilitol	Propionato sódico
Maltosa	Ribosa	Manitol	Citrato sódico
Xilosa	Trealosa		
Lactosa	Ramnosa		
Fructosa	Salicina		
Arabinosa	Glucosa		
Fuentes de carbono y nitrógeno			
Serina	Betaína	Sarcosina	
Valina	Arginina	Aspartato magnésico	
Alanina	Lisina	Glutamato sódico	
Prolina	Histidina		

3.4. ENSAYOS DE INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS

Para comprobar que las cepas aisladas en el estudio eran capaces de formar nódulos en habichuela, y analizar la efectividad de la fijación de nitrógeno, se inocularon plantas de la variedad de habichuela roja, José Beta.

3.4.1. Producción de plantas

Los ensayos se llevaron a cabo en cámara de crecimiento (Fitotron), con control de temperatura, luz y humedad, en la Universidad de León. Previo a la siembra, las semillas

fueron desinfectadas con HgCl_2 al 1% durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo fueron lavadas un mínimo de diez veces con agua destilada estéril para eliminar el agente desinfectante.

El sustrato empleado fue vermiculita exfoliada de las granulometrías nº 3 y nº 2 en la proporción 2:3 respectivamente (Verlite, España), empapada previamente en agua destilada y esterilizada en autoclave en bolsas de polipropileno (Sterilin, Reino Unido) durante 50 minutos a 121 °C. Se utilizaron recipientes de polipropileno opacos de 1 L de capacidad con 360 g del sustrato estéril (vermiculita empapada en agua) y en cada recipiente se sembraron cuatro semillas, de las cuáles después de germinar se eliminaron las plantas sobrantes para dejar el número final de dos plantas.

El cultivo de la habichuela se llevó a cabo en cámara de crecimiento, donde el fotoperíodo estuvo regulado (16 h de luz y 8 h de oscuridad), al igual que el termoperíodo (24°C durante las horas de luz y 18°C durante las de oscuridad) y la humedad relativa, fijada en el 65% \pm 5%. Además, la renovación del aire se llevó a cabo por la entrada de aire a presión empleado en la nebulización de agua descalcificada para mantener la humedad relativa en su valor. Las plantas crecieron durante 35 días, al final de los cuales fueron extraídas y su sistema radicular fue lavado. El diseño de los experimentos estuvo limitado por el tamaño de la cámara de crecimiento, de forma que en cada uno de ellos se utilizó un testigo sin inocular regado con la solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975) (Tabla 15) y otro testigo también sin inocular pero añadiendo a la solución de Rigaud nitrógeno químico en forma de NH_4NO_3 a una concentración de 1,4 g L^{-1} . Cada tratamiento constó de 16 plantas, que crecían en 8 vasos. El cronograma de las actividades para los experimentos se muestra en la Tabla 16. El diseño estadístico fue completamente aleatorio.

Tabla 15. Solución libre de nitrógeno (Rigaud y Puppo, 1975) para riego de plantas

Producto	Contenido en 1 litro
EDTA Fe_2Na_2	0,025 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0047 g
H_3BO_4	0,018 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01516 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0534 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
K_2HPO_4	0,200 g
KCl	0,200 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 00g
Agua	1,000 L

3.4.2. Inoculación de las plantas

Cada aislado fue producido de manera independiente en medio YMB para obtener un caldo con una concentración de células de al menos 10^9 UFC mL^{-1} tras una semana de

incubación a 28 °C. La inoculación de las plantas se realizó con 2 mL de caldo por planta, aplicados sobre la vermiculita en torno al cuello de la plántula siete días después de la siembra de la habichuela.

Tabla 16. Distribución temporal de las actividades realizadas en la cámara durante el cultivo de cada una de las tandas de plantas de habichuela

Día -6	Día -5	Día -4	Día -3	Día -2	Día -1	Día 0
		Preparación de vermiculita (lavado y esterilización)	Esterilización de agua para riego	Desinfección de cámara de crecimiento	Desinfección de vasos y recipientes	Siembra de <i>Rhizobium</i> en caldo YMB
Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Esterilización de semillas Siembra Riego con AGUA 220 mL	Cámara de crecimiento 16h-24°C luz / 8h-18°C oscuridad		Inoculación <i>Rhizobium</i> – <i>Phaseolus</i> 2 mL YMB/planta			Riego con SOLUCIONES NUTRITIVAS 220 mL
Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
			Riego con AGUA 240 mL			
Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21
			Riego con AGUA 240 mL			
Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28
	Riego con SN 240 mL					Riego con AGUA 250 mL
Día 29	Día 30	Día 31	Día 32	Día 33	Día 34	Día 35
						Recogida de plantas, lavado y secado en estufa a 70°C
Día 36	Día 37	Día 38	Día 39	Día 40	Día 41	Día 42
		Pesado de la planta seca 70°C - 72 h				

3.4.3. Análisis de la efectividad de fijación de nitrógeno

Las plantas extraídas de los recipientes de cultivo al cabo de los 35 días, se mantuvieron individualizadas y se secaron en estufa a 70 °C durante 72 h, tomando los datos de la biomasa aérea y subterránea.

Las plantas fueron molturadas con un molino de martillos y el material vegetal fue analizado para determinar el contenido de nitrógeno (%) mediante el método Kjeldahl, calculando la cantidad total de nitrógeno en la biomasa aérea.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza unidimensional mediante el programa SPSS Statistics 17 (SPSS Inc., EE.UU.). Las variables dependientes analizadas fueron la biomasa aérea, la biomasa subterránea, y el porcentaje y contenido total de nitrógeno en la biomasa aérea. El tratamiento de inoculación fue la variable independiente analizada en el ANOVA y consistió en los aislados bacterianos y cuatro controles sin inocular.

Los datos de eficiencia de fijación de N₂ y el porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación simbiótica atmosférica (%Ndfa) se obtuvieron a partir del dato del N en la biomasa

aérea, pero para ello fue necesario considerar los datos del control con N para referir la eficiencia de fijación de N₂ a un cultivo que recibiera una cantidad de N equivalente a su demanda (Beck *et al.*, 1993):

$$\text{Eficiencia (\%)} = 100 \cdot [(\text{N en biomasa aérea aislado} - \text{N en biomasa aérea control sin N}) / (\text{N en biomasa aérea control con N} - \text{N en biomasa aérea control sin N})]$$

$$\%Ndfa = 100 \cdot [(\text{N en biomasa aérea aislado} - \text{N en biomasa aérea control sin N}) / \text{N en biomasa aérea aislado}]$$



Figura 9. Vista de las plantas en la prueba de eficiencia en nitro fijación en cámara de crecimiento

3.5. ENSAYO EN MICROCOSMOS

Este ensayo se llevó a cabo en un invernadero con una extensión de 250 metros cuadrados (Figura 10), ubicado en el municipio de Sabana Larga perteneciente a la provincia de San José de Ocoa, República Dominicana.

Para realizar este ensayo se colectaron suelos de tres localidades diferentes, las cuales correspondían a los municipios de Constanza provincia de la Vega, Hondo Valle provincia de Elías Piña y Rancho Arriba provincia de San José de Ocoa.



Figura 10. Ensayo en microcosmos al inicio de la floración y el final del desarrollo en el momento de la cosecha

3.5.1. Suelos empleados en ensayos de microcosmos

Los suelos empleados como sustrato en estos experimentos provinieron de las tres provincias de la República Dominicana en las que se tomaron muestras de nódulos.

La recogida de suelo se hizo en días previos a la siembra en el invernadero, retirándose la capa superficial de restos vegetales y excavando hasta una profundidad de 30 cm, que es en la que se desarrolla la máxima densidad de raíces en el suelo. Los suelos se recogieron en sacos con capacidad para unas 100 libras de suelo, y se trasladaron hasta el invernadero, donde se llenaron 105 macetas con capacidad para 15 libras de suelo con cada suelo.

Los suelos empleados para los experimentos de microcosmos fueron analizados por la Universidad Autónoma Santo Domingo con los parámetros y resultados que aparecen en la Tabla 17. La falta del análisis de algunas características edafológicas generales importantes, se debió a las limitaciones propias del país.

3.5.2. Fertilización

La fertilización llevada a cabo en el suelo empleado en microcosmos se hizo para cubrir las necesidades de P y K del cultivo, y además, para satisfacer la demanda de nitrógeno del control fertilizado con nitrógeno. Los cálculos se realizaron siguiendo la metodología descrita por Urbano Terrón (2002) para fertilización mineral, basándose en los resultados de los análisis de suelos y las extracciones medias por hectárea de cada nutriente por parte del cultivo. Se consideró después la extracción individual por planta para un marco de plantación de 120.000 plantas por ha (Tabla 18).

3.5.2.1. Fertilización nitrogenada en el testigo con nitrógeno

Se utilizó sulfato amónico (riqueza del 21%) calculando la dosis a partir de las extracciones medias de nitrógeno del cultivo de judía grano (Urbano Terrón, 2002). Las extracciones se calcularon para un rendimiento esperado de 1000 kg ha⁻¹. La extracción media esperada fue 59 kg ha⁻¹, y la extracción por planta de 1,15 g de nitrógeno, correspondiéndose con 5,5 g de fertilizante por planta.

Tabla 17. Análisis de los suelos incluidos en el estudio de microcosmos

Parámetro	Unidad	Constanza (La Vega)		Rancho Arriba (San José de Ocoa)		Hondo Vale (Elías Piña)	
		Cantidad	Interpretación	Cantidad	Interpretación	Cantidad	Interpretación
pH (1:2 agua)		5,9		5,0		8,0	
Conductividad eléctrica (1:2 agua)	dS m ⁻¹	0,14	No salino	0,89	Ligeramente salino	0,18	No salino
PSI (Porcentaje sodio intercambiable)	%	2,0	No sódico	1,40	No sódico	0,30	No sódico
Materia Orgánica	%	3,49		4,28		3,49	
N total	%	0,28		0,35		0,22	
Macronutrientes							
P Olsen	mg kg suelo ⁻¹	13,6	Medio	10,0	Bajo	4,4	Muy Bajo
K iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	92,28	Bajo	82,89	Bajo	93,84	Bajo
Mesonutrientes							
Ca iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	435	Muy Bajo	812,8	Bajo	992,0	Bajo
Mg iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	67	Bajo	124,03	Muy alto	27,5	Alto
Micronutrientes							
Fe iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	52,20	Correcto	127,72	Correcto	10,20	Correcto
Mn iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	49,88	Correcto	8,36	Correcto	1,32	Correcto
Cu iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	1,08	Correcto	1,08	Correcto	0,84	Correcto
Zn iónico cambiabile	mg kg suelo ⁻¹	1,20	Correcto	1,32	Correcto	0,32	Carencia

3.5.2.2. Fertilización fosfatada

La fertilización fosfatada se basó en las extracciones esperadas por parte del cultivo, el contenido edáfico de fósforo proporcionado por el análisis, y otros factores agronómicos y edafológicos. Las extracciones de P₂O₅ se calcularon para un rendimiento esperado de 1000 kg ha⁻¹ según Urbano Terrón (2002).

Para determinar la dosis final de P₂O₅ se modificaron las extracciones mediante un coeficiente dependiente del nivel de fertilidad de P en el suelo, de su valor de pH y de la intensidad del sistema de cultivo (Tabla 18). El suelo de La Vega presentó un nivel medio, el de San José de Ocoa bajo y el de Elías Piña muy bajo. El fertilizante aplicado fue el superfosfato de cal, con una riqueza en P₂O₅ del 45%, correspondiendo a 1 g por planta en el suelo de La Vega y 1,5 g en los otros dos (Tabla 18).

3.5.2.3. Fertilización potásica

La dosis de fertilizante potásico se obtiene a partir de las extracciones de la planta, el nivel de K en el suelo y otros factores agronómicos y edafológicos. Las extracciones de K_2O se calcularon para un rendimiento esperado de 1000 kg ha^{-1} según Urbano Terrón (2002).

En la fertilización potásica se considera unos coeficientes que modifican las extracciones en función del nivel de fertilidad de potasio en el suelo, de la textura del mismo y de la intensidad del sistema de cultivo (Urbano Terrón, 2002). Para el fertilizante elegido (muriato de potasio de una riqueza en K_2O del 60%), los aportes por planta fueron de 1,5 g (Tabla 18).

Tabla 18. Resumen del esquema de fertilización

Elemento	Necesidades Alubia (‰)	Necesidades cultivo (1000 kg ha^{-1} producción)	Fertilizante (riqueza)	Suelo	Contenido edáfico de P y K (mg kg suelo^{-1})	Factor Corrección	Fertilización ($\text{kg P}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{O ha}^{-1}$)	Fertilización (g de fertilizante planta ⁻¹)
P	21 kg (P_2O_5)	21 kg ha^{-1}	Superfosfato de cal (45% P_2O_5)	Constanza (La Vega)	13,6	1,4	22,72	1
				Rancho Arriba (San José de Ocoa)	10,0	1,7	35,11	1,5
				Hondo Vale (Elías Piña)	4,4	1,7	35,11	1,5
K	39 kg (K_2O)	39 kg ha^{-1}	Muriato potásico (60%)	Constanza (La Vega)	92,28	1,2	46,57	1,5
				Rancho Arriba (San José de Ocoa)	82,89	1,2	46,57	1,5
				Hondo Vale (Elías Piña)	93,84	1,2	46,57	1,5

3.5.3. Diseño experimental de los ensayos en microcosmos

Las variables independientes fueron el suelo (Constanza, La Vega; Rancho Arriba, San José de Ocoa y Hondo Valle, Elías Piña) y los tratamientos de inoculación. El número de plantas por tratamiento y suelo fue de 15. Cada planta ocupó una maceta de las características anteriormente indicadas, con lo que el total de macetas fue de 315, 105 por cada suelo. El diseño estadístico fue de bloques completamente al azar, con cinco plantas por bloque y tres bloques o repeticiones.

Se sembraron cuatro semillas de alubia en cada maceta con el fin de asegurar la presencia de una planta por maceta, y se retiraron las plantas sobrantes antes de la inoculación. Las semillas fueron previamente desinfectadas superficialmente mediante la inmersión en hipoclorito sódico (NaClO) al 6% durante cinco minutos y sucesivos lavados con

agua estéril para retirar el desinfectante, de forma que no portasen microorganismos con capacidad de nodular o de interferir en la nodulación.

Cinco de los ocho aislados que presentaron la mayor efectividad en la fijación de nitrógeno en condiciones hidropónicas fueron empleados como tratamientos de inoculación (Tabla 19). La inoculación se realizó con un cultivo líquido del aislado, producido mediante crecimiento en medio YMB en agitación a 28 °C durante siete días. El volumen de inóculo fue de 10 mL con una concentración de al menos 10^9 UFC mL⁻¹, que se aplicaron en el cuello de la planta.

Tabla 19. Cepas utilizadas en los ensayos de microcosmos

Cepa	Provincia	Municipio	Localidad
ESC1120	Elías Piña	Hondo Valle	Sabana Chen
ESC1020	Elías Piña	Hondo Valle	Sabana Chen
OAC1020	San José de Ocoa	Rancho Arriba	Arroyo Caña
VLP1091	La Vega	Constanza	Las Palmas
VRI1020	La Vega	Constanza	El Río

3.5.3.1. Operaciones durante el cultivo en microcosmos.

Se llevaron a cabo dos riegos al día, con el volumen de agua necesario para mantener el suelo a capacidad de campo. La temperatura del invernadero era elevada, lo que justifica la necesidad de un riego tan frecuente.

En el transcurso del ensayo se presentaron dos plagas, *Spodoptera eridania* y *S. latifascia*, pertenecientes al orden Lepidóptera, Noctuidae y la mosca blanca *Bemisia tabaci*.

Para el control de *Spodoptera* se realizaron dos aplicaciones con el producto biológico Biolet 6-4 WP, insecticida Microbiológico a base de *Bacillus thuringiensis* a la dosis indicada por el fabricante y para el control de la *Bemisia tabacci* se utilizó el producto biológico Bionim 0,4 SL, insecticida de la familia de las Acridionas que lleva como materia activa Azadirachtina, a la dosis recomendada por el fabricante.

Las plantas adventicias que aparecieron a lo largo del cultivo fueron eliminadas de forma manual.

3.5.3.2. Análisis de datos

En condiciones de invernadero el ciclo del cultivo fue de aproximadamente tres meses, hasta el secado de las vainas. Se cosecharon las vainas y simultáneamente toda la biomasa aérea, colocando el material de cada planta por separado. Se determinó la biomasa seca aérea total y la de las semillas de cada planta, y se contó el número de semillas y de vainas por planta. La biomasa se determinó después de 72 h en estufa a 70 °C. Con los datos anteriores se calculó el número medio de semillas por vaina y el índice de cosecha de cada

planta, obtenido como la relación entre el peso de las semillas y el total de la biomasa aérea. También se determinó el peso de 100 semillas. Además, se molturaron las semillas obtenidas con un molinillo de martillos para determinar su contenido de N (Kjeldahl) y así cuantificar el nitrógeno total presente en las semillas de cada planta.

Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos mediante el paquete informático SPSS Statistics 17 (SPSS Inc., EE.UU.), analizando las variables dependientes biomasa aérea (g planta^{-1}), índice de cosecha (IC), número de vainas por planta y de semillas por vaina, peso de 100 semillas, rendimiento de semillas (g planta^{-1}), y % de nitrógeno y N total acumulado en las semillas (mg planta^{-1}).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

A partir de nódulos de plantas de *P. vulgaris* creciendo en diferentes localizaciones en República Dominicana se aislaron y seleccionaron colonias transparentes o blanquecinas y de apariencia mucosa en YMA que es la habitual de los rizobia. De este modo se seleccionaron un total de 23 cepas. Los nombres de cada una de las cepas y el sitio de aislamiento se listan en la Tabla 20.



Figura 11. Colonias sobre YMA formadas por las cepas aisladas en este estudio



Figura 12. Aspecto de los nódulos formados en *Phaseolus vulgaris*

4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

4.2.1. Morfología macroscópica

La morfología macroscópica se observó en placas de YMA y como se mencionó anteriormente todas las cepas presentaron colonias blanquecinas y mucosas típicas de los rizobia.

4.2.2. Morfología microscópica

La morfología celular se observó al microscopio óptico mediante tinción de Gram. Las bacterias pueden dividirse básicamente en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas son aquellas cuya pared celular está formada por una capa de finas láminas cuyo constituyente principal es el péptidoglucano (N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico). En las bacterias Gram negativas, además de la capa de péptidoglucano, existe una capa externa de lipopolisacáridos y proteínas que la rodea. Clásicamente, éste ha sido un método esencial para la caracterización microscópica de los microorganismos. Además de permitirnos conocer la estructura de la pared de las bacterias, la tinción de Gram posibilita la observación de la morfología celular.

Todos los aislados del estudio presentaron una morfología de bacilos cortos, Gram negativos y no esporulados (Figura 13). Esta morfología corresponde con la presentada por todos los rhizobia.

Tabla 20. Cepas analizadas en este estudio

Cepas	Lugar de Procedencia	Municipio	Provincia	Latitud, Longitud
ELF1060	La Fuente	Hondo Valle	Elías Piña	N 18° 42,866'; W 71° 40,319'
ESC1020	Sabana Chen	Hondo Valle	Elías Piña	N 18° 42,353'; W 71° 36,852'
ESC1060	Sabana Chen	Hondo Valle	Elías Piña	<i>id.</i>
ESC1110	Sabana Chen	Hondo Valle	Elías Piña	<i>id.</i>
ESC1120	Sabana Chen	Hondo Valle	Elías Piña	<i>id.</i>
ESC1150	Sabana Chen	Hondo Valle	Elías Piña	<i>id.</i>
OAC1020	Arroyo Caña	San José de Ocoa	San José de Ocoa	N 18° 42,346'; W 70° 27,356'
OAC1031	Arroyo Caña	San José de Ocoa	San José de Ocoa	<i>id.</i>
OAC1140	Arroyo Caña	San José de Ocoa	San José de Ocoa	<i>id.</i>
OAC1150	Arroyo Caña	San José de Ocoa	San José de Ocoa	<i>id.</i>
OLQ1040	Los Quemaos	San José de Ocoa	San José de Ocoa	N 18° 42,427'; W 70° 27,342'
OLQ1051	Los Quemaos	San José de Ocoa	San José de Ocoa	<i>id.</i>
OLQ1052	Los Quemaos	San José de Ocoa	San José de Ocoa	<i>id.</i>
VAR1140	Arenazo	Constanza	La Vega	sin datos
VCS3041	Cañada Seca	Constanza	La Vega	N 18° 54,769'; W 70° 42,516'
VCS3080	Cañada Seca	Constanza	La Vega	<i>id.</i>
VCS3090	Cañada Seca	Constanza	La Vega	<i>id.</i>
VLP1091	Las Palmas	Constanza	La Vega	N 19° 00,736'; W 70° 34,816'
VPA1010	Palero	Constanza	La Vega	N 18° 54,419'; W 70° 42,009'
VPA1020	Palero	Constanza	La Vega	<i>id.</i>
VPA1100	Palero	Constanza	La Vega	<i>id.</i>
VRI 2100	El Río	Constanza	La Vega	N 18° 58,979'; W 70° 36,936'
VRI2090	El Río	Constanza	La Vega	<i>id.</i>

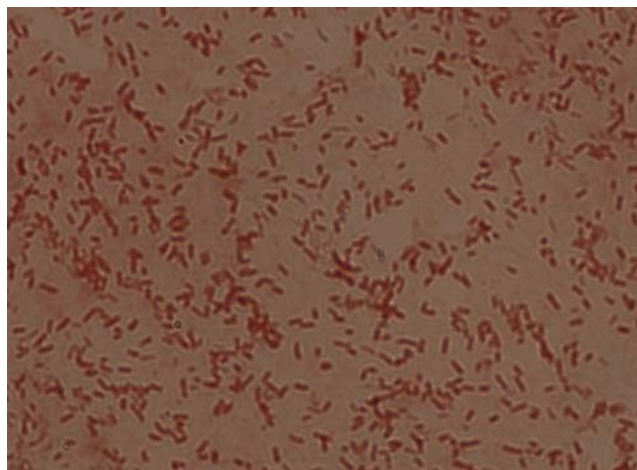


Figura 13. Morfología presentada por las cepas aisladas en la tinción de Gram

4.3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

4.3.1. Análisis de los perfiles de TP-RAPD

Los perfiles de TP-RAPD se describieron en el año 2001 y se basan en la obtención de perfiles de DNA por electroforesis directa del producto de PCR obtenido tras la amplificación con primers basados en la secuencia del ADN ribosómico 16S (Rivas *et al.*, 2001). Los perfiles obtenidos permiten diferenciar especies y/o subespecies, dos niveles aceptados taxonómicamente (Rivas *et al.*, 2002a). Por ello, estos métodos resultan adecuados para agrupar los aislados de una población y seleccionar un representante de cada grupo con la finalidad de identificarlos mediante secuenciación del ADN ribosómico 16S y determinar las relaciones filogenéticas con taxones establecidos. En el presente trabajo se utilizaron los primers 879F y 1522R que tienen un alto contenido en G+C y han sido utilizados anteriormente para el análisis de poblaciones de bacterias (Rivas *et al.*, 2002a). Concretamente se han utilizado para agrupar y seleccionar cepas aisladas a partir de nódulos de *P. vulgaris* en España (García-Fraile *et al.*, 2010).

Los resultados de este análisis muestran la diversidad genética de los aislados ya que se hallaron ocho perfiles de TP-RAPD diferentes (Tabla 21 y Figura 14).

El perfil I fue el mayoritario y lo presentaron siete cepas aisladas en 5 de los 10 suelos analizados. A continuación los perfiles III y IV fueron presentados por cinco y cuatro cepas, respectivamente, en ambos casos aislados en dos suelos diferentes. Los perfiles II y V, aunque estuvieron representados en ambos casos, sólo por dos cepas, éstas procedían de diferentes suelos. Finalmente los perfiles VI, VII y VIII estuvieron representados en todos los casos por una sola cepa, pero de diferente procedencia geográfica.

Teniendo en cuenta que especies diferentes presentan diferentes perfiles de TP-RAPD (Rivas *et al.*, 2001) y que también dentro de una misma especie, subespecies diferentes pueden presentar diferencias entre sus perfiles (Rivas *et al.*, 2002a), podemos concluir que los aislados de este estudio podrían pertenecer a varias especies y/o subespecies diferentes. Por lo tanto se seleccionó un representante de cada grupo para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S.

Tabla 21. Grupos de TP-RAPD obtenidos con las cepas de este estudio

GRUPO	CEPAS
Grupo I	VPA1010, VPA1100, OLQ1051, OLQ1052, VRI2100, VAR1140, VCS3090
Grupo II	OLQ1040, VLP1091
Grupo III	ESC1020, ESC1110, ESC1120, ESC1150, VCS3080
Grupo IV	OAC1020, OAC1031, OAC1140, VCS3041
Grupo V	ELF1060, VPA1020
Grupo VI	OAC1150
Grupo VII	VRI2090
Grupo VIII	ESC1060

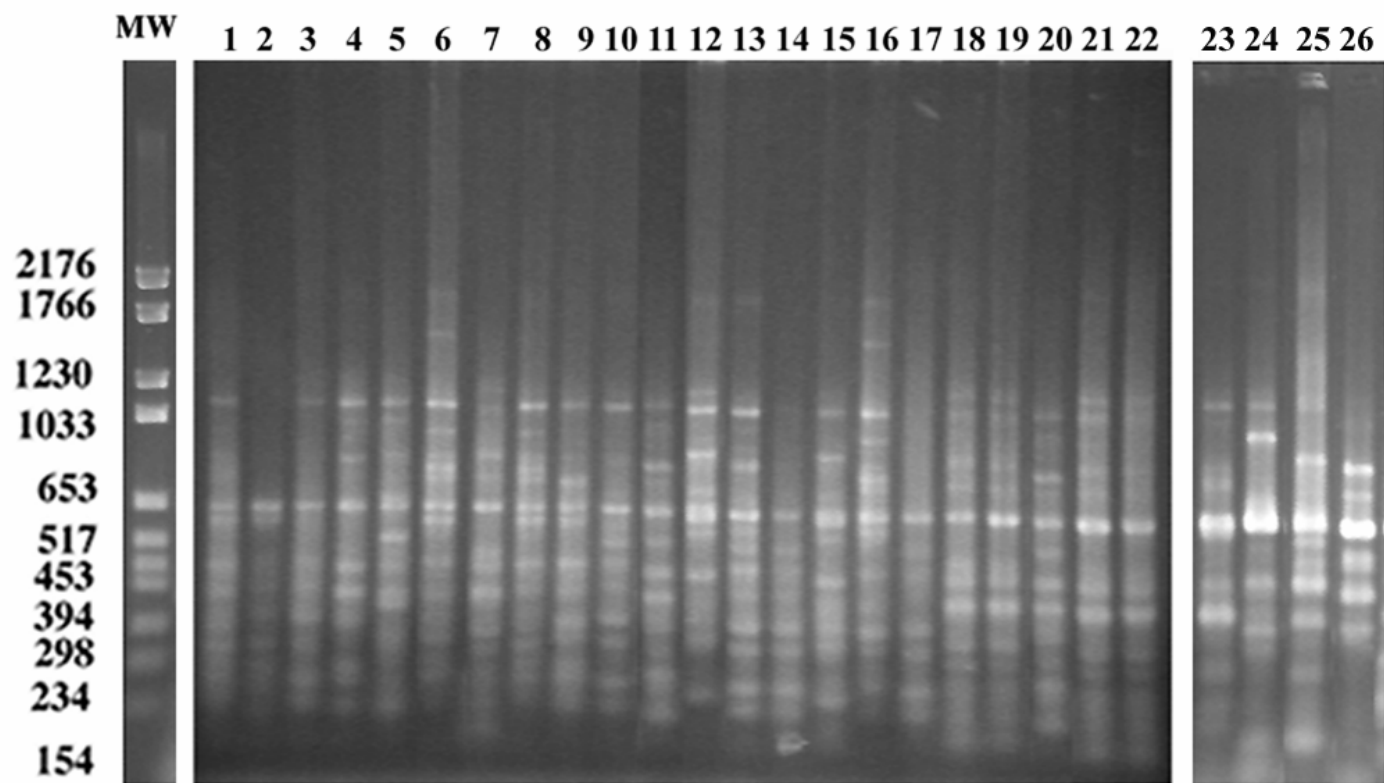


Figura 14. Perfiles de TP-RAPD de las cepas de este estudio. M: Marcador de pesos moleculares VI de Roche. Carril 1: VPA1010, carril 2: OLQ1052, carril 3: VRI2010, carril 4: OAC1150, carril 5: VRI2090, carril 6: VAR1140, carril 7: ESC1110, carril 8: VPA1100, carril 9: OLQ1051, carril 10: OAC1020, carril 11: OLQ1040, carril 12: ELF1060, carril 13: VCS3041, carril 14: OAC1140, carril 15: VPA1020, carril 16: VCS3090, carril 17: OAC1031, carril 18: ESC1020, carril 19: ESC1150, carril 20: VLP1091, carril 21: VCS3090, carril 22: ESC1120, carril 23: *R. etli* CFN42^T, carril 24: *R. pisi* DSM 30132^T, carril 25: *R. phaseoli* ATCC 14482^T, carril 26: *R. leguminosarum* USDA 2370^T.

4.3.2. Secuenciación y análisis filogenético del gen ribosómico 16S

Como se ha explicado previamente, la clasificación filogenética de las bacterias está basada en el gen ribosómico 16S y por lo tanto este es el gen comúnmente usado para la clasificación de los rhizobia (Kuykendall, 2005). En este estudio se obtuvieron sus secuencias completas en cepas representativas de los diferentes grupos de TP-RAPD. Estas secuencias se compararon con las de las especies de la familia *Rhizobiaceae*. Los resultados se muestran en la Figura 15 y la Tabla 22.

Las cepas de los grupos I y VIII, mostraron entre sí, y con respecto a las cepas tipo de *R. phaseoli* ATCC 14482^T, *R. pisi* DSM 30132^T y *R. fabae* CCBAU 33202^T porcentajes de similitud cercanos al 99,9% y con respecto a *R. etli* CFN42^T de aproximadamente 99,4%. Teniendo en cuenta estos porcentajes de similitud son similares con respecto a varias especies del género *Rhizobium*, es necesario analizar genes que presenten mayor variabilidad para establecer la especie a la que pertenecen las cepas de los grupos I y VIII.

Las cepas representativas de los grupos II y IV mostraron idéntica secuencia del 16S entre ellas y una similitud del 99,8% con respecto a las cepas representativas de los grupos VI y VII. La similitud fue ligeramente más baja, 99,7%, con respecto a las cepas del grupo III, pero todas ellas formaron un cluster con la cepa tipo de *R. etli* CFN42^T con respecto a la cuál presentaron similitudes del 100% las cepas del grupo III y del 99,7% las cepas del resto de los grupos de este cluster. Estos resultados, al igual que ocurría con las cepas de los grupos I y VIII, muestran la necesidad de analizar genes que presenten mayor variabilidad que el gen ribosómico 16S.

Las cepas del grupo V presentaron una similitud del 100% con respecto a la cepa tipo de *R. leguminosarum* USDA 2370^T. Aunque este elevado valor podría indicar que las cepas del grupo V pertenecen a esta especie, teniendo en cuenta que se han descrito especies diferentes dentro del género *Rhizobium* que presentan identidades muy cercanas al 100% en sus secuencias del gen ribosómico 16S, para identificar las cepas de este grupo también es necesario llevar a cabo el análisis de genes que presenten mayor variabilidad en su secuencia que dicho gen ribosómico (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006).

En resumen, los resultados obtenidos tras el análisis del gen ribosómico 16S muestran que los aislados de habichuela obtenidos en suelos de República Dominicana pertenecen mayoritariamente a clusters relacionados con *R. phaseoli* o *R. etli* ya que sólo los aislados del grupo V fueron filogenéticamente próximos a otra especie, *R. leguminosarum*. Estos resultados contrastan con los obtenidos en zonas europeas en la que *P. vulgaris* es frecuentemente cultivada, como sucede en Castilla y León en España, en la que la especie mayoritaria fue *R. leguminosarum* (García-Fraile *et al.*, 2010). En cambio coinciden con los obtenidos en el Sur de España en el que la especie mayoritaria fue *R. etli* (Herrera-Cervera *et*

al., 1995; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). Los resultados en República Dominicana parecen apoyar la hipótesis del origen americano de la mayoría de los endosimbiontes de la alubia, ya que las dos especies mayoritarias tienen un origen americano. Sin embargo, sorprende la cercanía de algunas cepas, las del grupo V, con respecto a cepas de *R. leguminosarum*, una especie que puede ser de origen europeo (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009). No obstante, es necesario estudiar genes con mayor tasa evolutiva para establecer si las cepas próximas a *R. leguminosarum* pertenecen realmente a esta especie y para ello se han seleccionado los mismos genes que ya se han secuenciado previamente en las cepas ya publicadas, *recA* y *atpD*.

4.3.3. Secuenciación y análisis filogenético de los genes *recA* y *atpD*

Los genes que codifican para proteínas esenciales ("housekeeping genes"), con una divergencia en las secuencias mayor que los que codifican para genes ribosómicos, pero suficientemente conservados para retener información filogenética y permitir el diseño de primers que actúen como origen de su amplificación, han sido sugeridos como marcadores filogenéticos alternativos (Stackebrandt *et al.*, 2002).

El Comité de Taxonomía Bacteriana sugirió en 2002 (Stackebrandt *et al.*, 2002) que deben emplearse al menos cinco genes para una buena distinción de las especies de sus taxones relacionados. Sin embargo, un estudio posteriormente realizado por Zeigler (2003) utilizando unos 30 genes y analizando la información adicional que aporta cada uno de ellos, probó que combinando los datos de dos o tres genes, si su elección es adecuada, se puede obtener una información de las relaciones del genoma completo de taxones próximos que iguala e incluso supera a la derivada de los datos de hibridación de ADN-ADN.

Diversos genes esenciales para el mantenimiento de la célula, "housekeeping genes" se han empleado como marcadores filogenéticos en rhizobia, entre los que cabe destacar los genes *recA* y *atpD* (Gaunt *et al.*, 2001; Martens *et al.*, 2007), *glnA*, *glnB* (Martens *et al.*, 2007; Turner y Young, 2000; Wernegreen y Riley, 1999) y *dnaK* (Eardly *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2007; Stepkowski *et al.*, 2003). Dentro de ellos, los únicos que se han secuenciado en prácticamente todas las especies de rhizobia, desde que fueron propuestos por Gaunt *et al.* (2001) como marcadores taxonómicos de estos microorganismos, son los genes *recA* y *atpD* que codifican, respectivamente, para parte del sistema de recombinación y reparación de ADN y para la subunidad β de la ATP-sintetasa de membrana, esencial para la producción de energía.

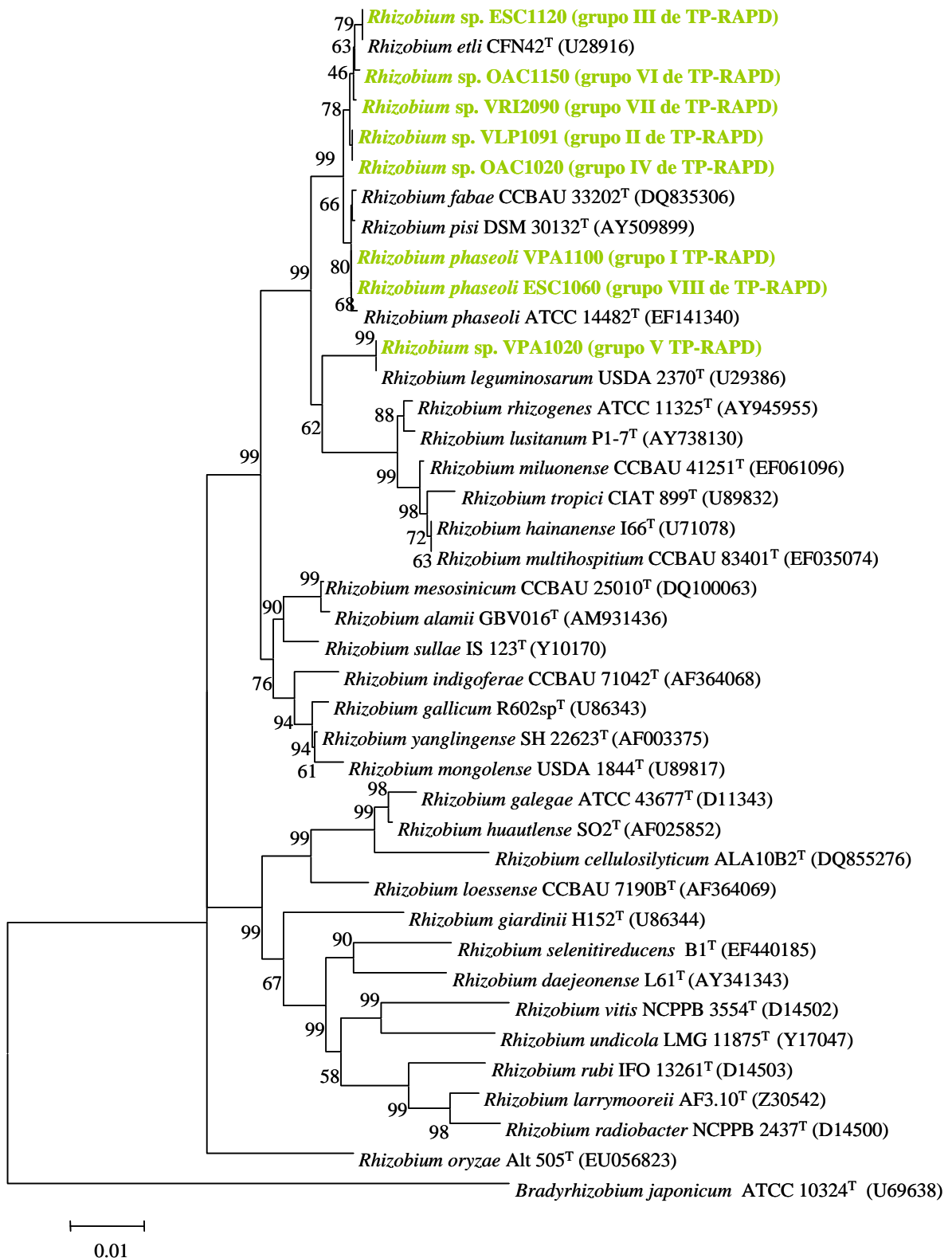


Figura 15. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados de *P. vulgaris* en este estudio y de las especies actualmente descritas de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

Ambos genes se han secuenciado en la mayoría de las especies de rhizobia de crecimiento rápido (Santillana *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006; Vinuesa *et al.*, 2005b; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009) y por ello estos dos genes se han analizado en una cepa representativa de los diferentes perfiles de TP-RAPD hallados en este estudio.

Los porcentajes de similitud de los genes *recA* y *atpD* con respecto a las especies más próximas se reflejan en la Tabla 23. Los resultados del análisis del gen *recA* se muestran en la Figura 16 y Tabla 24 y los del *atpD* la Figura 17 y Tabla 25. De acuerdo con estos resultados y en consonancia con los del análisis del gen ribosómico 16S, las cepas representativas de los diferentes grupos de TP-RAPD obtenidos en este estudio pertenecen al género *Rhizobium*. Sin embargo, las distancias obtenidas con respecto a las especies *R. etli*, *R. phaseoli* y *R. leguminosarum*, las tres especies más próximas de acuerdo con las secuencias del gen ribosómico 16S, fueron muy superiores, exceptuando las cepas de los grupos I y VIII que son filogenéticamente muy próximas a la cepa tipo de la especie *R. phaseoli* ATCC 14482^T con similitudes del 99.6% en el caso de la cepa VPA1100, representativa del grupo I y del 97.9% en el caso de la cepa ESC1060, representativa del grupo VIII. Los valores de similitud en el caso del gen *atpD* fueron también superiores al 99.5% en ambos grupos I y VIII con respecto a la cepa tipo de la especie *R. phaseoli* ATCC 14482^T. Estos elevados valores de similitud en ambos genes confirman los obtenidos en el caso del gen ribosómico 16S y muestran que las cepas de estos grupos pertenecen a la especie *R. phaseoli*.

El resto de las cepas pertenecen a grupos o representan líneas filogenéticas independientes muy alejadas de las especies actualmente descritas en el género *Rhizobium*. En general los genes *recA* de las cepas aisladas en este estudio fueron también divergentes entre los diferentes grupos de TP-RAPD, si exceptuamos a las cepas representativas de los grupos II y VI, que fueron filogenéticamente muy próximas con similitudes inferiores al 94%. En el caso del gen *atpD*, estas cepas fueron también próximas a las cepas representativas de los grupos IV y VII con similitudes superiores al 96%.

Las cepas representativas de los grupos II, IV y VI, VLP1091, OAC1020 y OAC1150, respectivamente, formaron un grupo claramente separado de todas las especies actualmente reconocidas en el género *Rhizobium* después del análisis de ambos genes, *recA* y *atpD*. Los valores de similitud con respecto al resto de las cepas descritas del género *Rhizobium* fueron inferiores al 92% en el caso del gen *recA* y del 93% en el caso del gen *atpD*. Por lo tanto claramente estas cepas no pertenecen a ninguna de las especies descritas hasta este momento en el género *Rhizobium*. Pero, a pesar de que las tres cepas ocupan un mismo grupo, la distancia del gen *recA* entre la cepa VLP1091 y las otras dos es demasiado alta (similitud inferior al 91%) para poder asegurar que pertenecen a la misma especie. Lo mismo

puede decirse con respecto a la cepa VRI2090, representativa del grupo VII que, a pesar de presentar una similitud muy alta en el caso del gen *atpD* (mayor del 98%), tiene un gen *recA* muy divergente con similitudes inferiores al 89%.

La cepa ESC1120, representativa del grupo III, presentó una similitud inferior al 93% en el gen *recA* y al 95% en el gen *atpD* con respecto a las cepas tipo de todas las especies del género *Rhizobium* y, por lo tanto, este grupo posiblemente representa también una nueva especie de este género.

La cepa VPA1020, representativa del grupo V, presentó una similitud del 96.1% en el gen *recA* con respecto a *R. phaseoli* ATCC 14482^T, sin embargo la similitud en el gen *atpD* fue inferior al 93%, presentando una similitud mucho mayor, 94,81%, con respecto a *R. leguminosarum* USDA 2370^T. Por lo tanto la clasificación del grupo V es incierta de acuerdo con estos resultados.

Por lo tanto los resultados del análisis de los genes *recA* y *atpD* muestran la gran diversidad filogenética de las cepas que nodulan *P. vulgaris* en República Dominicana y la posibilidad de que algunos de los grupos de cepas aislados constituyan especies nuevas del género *Rhizobium*, sin embargo, algunas cepas no mostraron consistencia en la posición filogenética cuando ambos genes se analizaron por separado, por lo cuál se analizaron también conjuntamente.

Tabla 23. Porcentajes de similitud de las secuencias del gen ribosómico 16S y los genes *atpD* y *recA*.

GRUPO DE TP-RAPD	REPRESENTANTE/S	ESPECIE MÁS PRÓXIMA	
		GEN	IDENTIDADES
I	VPA1100	16S	99,9% <i>R. pisi</i> , <i>R. fabae</i> y <i>R. phaseoli</i>
		<i>atpD</i>	94,0% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	99,6% <i>R. phaseoli</i>
II	VLP1091	16S	99,9% <i>R. pisi</i> , <i>R. fabae</i> y <i>R. phaseoli</i>
		<i>atpD</i>	93,5% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	92,0 % <i>R. leguminosarum</i>
III	ESC1120	16S	100% <i>R. etli</i>
		<i>atpD</i>	94,8% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	95,6% <i>R. leguminosarum</i>
IV	OAC1020	16S	99,9% <i>R. pisi</i> , <i>R. fabae</i> y <i>R. phaseoli</i>
		<i>atpD</i>	94,1% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	92,0% <i>R. leguminosarum</i>
V	VPA1020	16S	99,2% <i>R. pisi</i> y <i>R. phaseoli</i>
		<i>atpD</i>	94,8% <i>R. leguminosarum</i>
		<i>recA</i>	91,3% <i>R. etli</i>
VI	OAC1150	16S	91,2% <i>R. fabae</i>
		<i>atpD</i>	94,2% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	91,2% <i>R. pisi</i>
VII	VRI2090	16S	99,7% <i>R. pisi</i>
		<i>atpD</i>	93,6% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	92,8% <i>R. radiobacter</i>
VIII	ESC1060	16S	99,9% <i>R. pisi</i> , <i>R. fabae</i> y <i>R. phaseoli</i>
		<i>atpD</i>	94,5% <i>R. etli</i>
		<i>recA</i>	90,5% <i>R. fabae</i>

Tabla 24. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen *atpD*

	<i>R. gallicum</i>	<i>R. yanglingense</i>	<i>R. mongolense</i>	<i>R. sulae</i>	<i>R. huaultense</i>	<i>R. galegae</i>	<i>R. radiobacter</i>	<i>R. daejeonense</i>	<i>R. selenitireducens</i>	<i>R. gjardinii</i>	<i>R. mesosinicum</i>	OAC1020	ESC1120	VLP1091	OAC1150	VRZ090	ESC1060	<i>R. phaseoli</i>	VPA1100	<i>R. etli</i>	<i>R. fabae</i>	<i>R. pisi</i>	<i>R. alarii</i>	<i>R. indigoferae</i>	<i>R. leguminosarum</i>	VPA1020	<i>R. multihospitium</i>	<i>R. tropici</i>	<i>R. lusitanum</i>	<i>R. rhizogenes</i>	<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>R. rubi</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. vitis</i>			
<i>R. gallicum</i>	---																																				
<i>R. yanglingense</i>	99.09	---																																			
<i>R. mongolense</i>	98.19	98.64	---																																		
<i>R. sulae</i>	95.09	95.56	95.09	---																																	
<i>R. huaultense</i>	87.98	88.44	88.66	87.21	---																																
<i>R. galegae</i>	87.98	88.21	88.44	88.84	90.74	---																															
<i>R. radiobacter</i>	89.32	90.23	89.77	90.21	88.46	88.01	---																														
<i>R. daejeonense</i>	87.76	87.07	86.85	87.67	85.53	87.58	90.05	---																													
<i>R. selenitireducens</i>	89.34	89.34	89.12	89.47	86.32	92.33	90.05	90.85	---																												
<i>R. gjardinii</i>	90.02	90.48	90.25	89.95	83.97	89.62	89.82	89.24	92.18	---																											
<i>R. mesosinicum</i>	90.70	91.16	91.16	92.15	89.46	90.29	89.37	90.27	90.83	90.93	---																										
OAC1020	90.25	90.70	89.80	92.24	86.18	88.04	88.69	89.80	90.14	91.26	96.08	---																									
ESC1120	91.12	91.57	91.12	91.99	89.21	89.34	90.68	90.61	91.99	90.87	96.06	95.33	---																								
VLP1091	89.80	90.25	89.34	91.78	87.72	88.04	88.91	89.86	90.00	89.83	94.47	96.57	94.31	---																							
OAC1150	90.28	90.74	90.28	92.01	87.70	89.40	89.61	90.38	90.13	90.60	95.65	95.97	93.95	98.21	---																						
VRZ090	91.23	91.71	90.76	92.82	88.10	89.39	90.54	91.53	90.83	91.76	95.32	96.80	94.50	98.63	98.63	---																					
ESC1060	89.56	90.02	90.02	90.39	86.16	88.45	89.81	89.06	90.38	91.07	94.72	93.75	94.83	93.27	93.50	93.35	---																				
<i>R. phaseoli</i>	88.89	89.34	89.34	90.41	81.34	87.81	88.91	88.57	89.77	90.51	94.09	93.88	94.41	92.93	93.29	93.14	99.55	---																			
VPA1100	88.66	89.12	89.12	90.18	85.75	87.81	88.91	88.44	89.80	90.26	93.85	93.74	94.31	93.00	93.29	93.14	99.78	99.57	---																		
<i>R. etli</i>	88.89	89.34	88.89	89.30	88.94	89.62	88.24	88.71	89.84	90.74	95.03	94.13	94.78	93.45	94.24	93.63	94.46	94.13	94.13	---																	
<i>R. fabae</i>	89.33	89.79	89.79	89.50	83.26	88.91	89.81	87.39	89.96	89.96	91.97	92.72	91.91	92.15	91.99	93.06	93.22	93.05	92.15	---																	
<i>R. pisi</i>	89.57	90.02	90.02	90.41	82.44	88.94	89.37	86.98	89.46	89.45	92.61	92.83	91.26	91.94	92.39	92.91	93.08	92.12	92.14	91.42	98.30	---															
<i>R. alarii</i>	90.71	91.19	91.19	90.47	83.41	87.91	88.12	89.31	88.81	88.14	93.18	92.99	92.40	92.87	93.79	93.32	91.74	91.92	91.72	91.00	92.36	92.78	---														
<i>R. indigoferae</i>	85.94	86.39	86.39	87.44	80.63	84.65	86.65	85.43	87.20	87.13	88.72	89.53	89.75	90.83	90.38	91.08	91.74	91.24	91.25	88.71	91.70	91.05	91.05	---													
<i>R. leguminosarum</i>	86.85	87.30	87.30	87.67	86.00	85.10	87.10	85.10	86.91	87.81	88.71	89.62	89.57	90.97	90.78	91.75	92.38	91.42	91.42	89.39	92.15	91.42	91.00	99.10	---												
VPA1020	87.30	87.76	87.76	89.27	81.67	86.91	87.10	86.39	88.27	88.61	90.98	91.63	91.06	91.57	91.95	92.22	92.86	91.24	92.37	90.74	93.86	93.51	91.92	94.44	94.81	---											
<i>R. multihospitium</i>	89.80	90.25	90.25	92.01	83.23	90.74	90.95	89.14	90.78	91.35	93.85	92.80	93.74	91.40	92.17	93.14	92.19	90.96	92.26	92.55	91.06	91.06	91.25	87.06	86.68	88.93	---										
<i>R. tropici</i>	89.80	90.25	89.57	91.40	88.71	88.94	90.95	90.29	90.52	91.42	93.91	92.78	93.88	92.10	92.63	93.87	91.69	91.65	91.42	92.55	90.30	89.84	91.23	86.91	87.36	88.04	96.61	---									
<i>R. lusitanum</i>	90.25	90.70	90.25	90.41	80.45	88.94	90.05	87.77	90.46	90.30	91.75	91.83	90.85	91.11	91.50	92.68	89.51	88.45	89.09	89.84	89.62	90.82	90.61	87.90	88.49	89.04	91.55	91.87	---								
<i>R. rhizogenes</i>	88.30	88.76	88.99	89.23	87.44	90.18	91.08	89.50	90.64	90.87	92.01	91.32	92.22	91.32	91.18	92.42	91.16	90.18	90.18	91.32	89.77	89.73	90.71	87.90	88.36	88.36	94.06	94.29	94.06	---							
<i>R. cellulosilyticum</i>	86.62	86.62	85.94	86.99	83.76	90.07	88.24	88.21	90.02	87.55	89.36	88.71	89.54	88.96	89.04	90.16	88.62	88.31	88.33	89.39	87.34	87.40	87.02	85.37	85.10	85.98	89.10	88.71	87.60	90.18	---						
<i>R. rubi</i>	86.39	86.85	86.62	87.21	82.05	88.94	87.78	86.29	89.43	89.66	87.83	88.91	88.48	88.31	88.37	89.24	88.84	88.61	88.31	87.81	88.21	86.92	86.80	85.44	85.33	86.92	88.40	88.26	88.40	89.95	89.87	---					
<i>R. oryzae</i>	83.57	83.57	82.86	84.83	79.83	83.64	85.95	85.27	86.98	84.33	85.15	85.94	86.14	84.81	84.81	85.58	85.97	86.27	85.94	85.05	84.33	85.16	85.59	83.44	83.41	86.05	86.64	85.05	84.55	84.94	84.55	84.77	---				
<i>R. vitis</i>	79.14	79.82	79.37	80.82	76.92	79.46	81.67	79.32	79.70	79.75	79.65	79.32	79.57	79.87	79.87	81.24	81.03	80.38	79.87	79.91	80.79	79.54	80.76	79.11	79.01	79.75	79.96	79.68	79.32	80.59	81.01	83.97	85.68	---			

Los nombres de las especies hacen referencia a las secuencias de las cepas tipo indicadas en el análisis filogenético

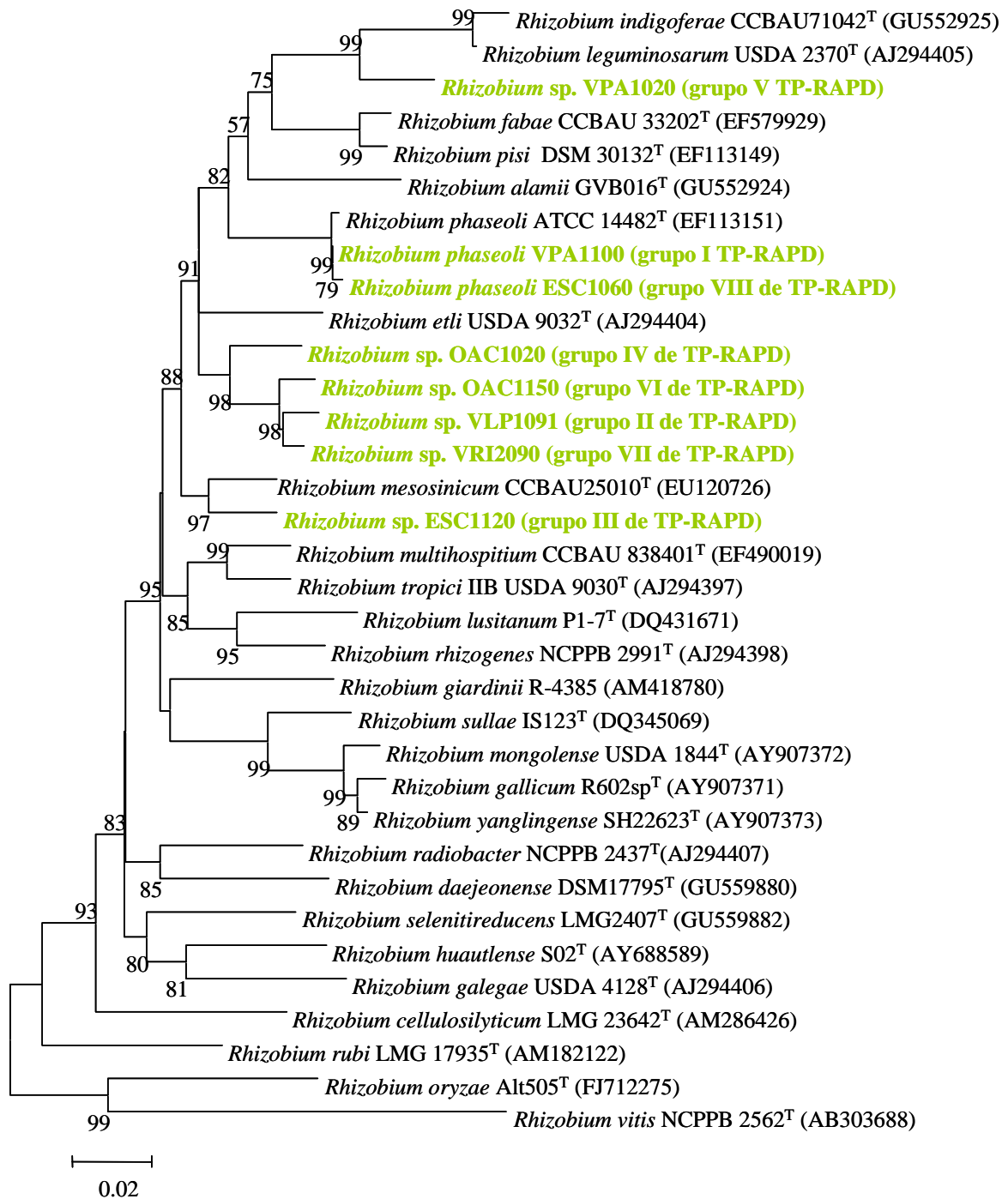


Figura 16. Análisis filogenético del gen *atpD* de los aislados a partir de nódulos de *P. vulgaris* en este estudio y diferentes especies del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

Tabla 25. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen *recA*

	<i>R. mongolense</i>	<i>R. yanglingense</i>	<i>R. mesosinicum</i>	<i>R. selenitireducens</i>	<i>R. galegae</i>	VRI2090	<i>R. radiobacter</i>	<i>R. vitis</i>	<i>R. cellulostypticum</i>	<i>R. tropici</i>	<i>R. rhizogenes</i>	<i>R. lusitanum</i>	<i>R. giardinii</i>	<i>R. rubi</i>	<i>R. huautlense</i>	<i>R. gallicum</i>	<i>R. daejeonense</i>	OAC1020	<i>R. indigoferae</i>	<i>R. leguminosarum</i>	VPA1100	<i>R. phaseoli</i>	ESC1060	VPA1020	ESC1120	VLP1091	OAC1150	<i>E. etli</i>	<i>R. alamii</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. sullae</i>	<i>R. multihospitium</i>	<i>R. fabae</i>	<i>R. pisi</i>		
<i>R. mongolense</i>	---																																			
<i>R. yanglingense</i>	98.33	---																																		
<i>R. mesosinicum</i>	90.42	90.83	---																																	
<i>R. selenitireducens</i>	89.42	89.15	87.83	---																																
<i>R. galegae</i>	89.79	88.96	86.40	89.68	---																															
VRI2090	87.92	87.29	86.45	87.73	87.68	---																														
<i>R. radiobacter</i>	85.93	85.50	82.37	85.98	86.21	92.81	---																													
<i>R. vitis</i>	80.92	80.71	81.67	79.37	82.08	81.68	82.15	---																												
<i>R. cellulostypticum</i>	87.92	86.88	87.75	87.04	87.80	86.24	85.83	80.83	---																											
<i>R. tropici</i>	87.29	87.50	87.80	86.77	86.30	88.50	85.83	80.00	85.55	---																										
<i>R. rhizogenes</i>	88.13	88.13	89.00	87.30	85.74	86.65	85.24	78.33	86.30	93.06	---																									
<i>R. lusitanum</i>	87.92	87.50	87.52	88.62	86.30	86.86	85.24	81.46	85.79	90.99	91.93	---																								
<i>R. giardinii</i>	85.98	85.98	84.18	85.98	86.07	84.08	85.25	81.51	83.97	86.07	85.86	86.37	---																							
<i>R. rubi</i>	85.29	84.83	82.42	83.86	84.84	85.20	86.48	82.65	84.57	82.99	81.76	83.97	86.37	---																						
<i>R. huautlense</i>	88.75	89.17	85.57	86.24	87.99	84.60	85.05	80.42	86.36	85.18	86.30	84.52	86.17	85.17	---																					
<i>R. gallicum</i>	97.47	98.85	88.79	88.10	87.09	86.10	84.22	80.82	86.17	87.30	88.11	87.78	85.77	84.17	88.98	---																				
<i>R. daejeonense</i>	86.61	86.89	87.16	85.52	87.98	84.66	84.43	80.87	85.25	86.07	84.43	86.34	86.89	84.43	84.70	85.79	---																			
OAC1020	91.18	90.76	88.08	89.15	88.80	87.06	85.58	80.38	85.69	87.29	88.05	88.42	85.31	83.70	87.17	91.15	87.70	---																		
<i>R. indigoferae</i>	90.22	90.44	90.00	88.10	87.33	84.98	83.11	80.00	86.00	87.78	88.22	86.89	82.99	82.76	87.11	89.66	86.89	90.89	---																	
<i>R. leguminosarum</i>	90.42	90.42	89.20	88.10	87.24	86.24	84.08	79.58	86.49	88.18	88.93	87.80	83.61	82.58	86.12	90.57	86.89	92.03	99.33	---																
VPA1100	88.33	88.33	87.45	87.83	86.68	88.09	84.66	79.58	85.35	87.24	86.87	87.79	83.57	82.97	85.71	89.38	86.89	91.18	90.67	91.56	---															
<i>R. phaseoli</i>	88.52	88.52	87.10	87.80	86.77	88.27	84.88	79.54	85.36	86.58	86.58	87.09	82.73	82.73	85.16	88.91	86.58	90.75	90.42	91.05	99.61	---														
ESC1060	87.56	87.78	86.60	87.77	85.89	86.77	83.06	79.47	84.07	86.49	85.69	86.29	82.85	82.85	85.08	88.49	86.81	90.08	90.09	90.52	98.39	97.93	---													
VPA1020	89.36	89.36	87.55	88.86	87.42	87.94	84.27	79.70	84.58	87.63	87.22	87.63	84.46	83.59	85.80	89.28	87.67	91.87	91.98	92.70	96.55	96.14	95.76	---												
ESC1120	88.89	88.47	86.72	86.77	87.55	87.27	85.44	81.04	85.58	86.98	87.17	86.78	85.37	83.57	86.51	89.18	86.07	90.81	92.22	93.21	93.29	92.56	92.14	93.91	---											
VLP1091	89.31	88.89	88.53	89.68	88.68	88.50	85.44	79.38	87.06	87.92	88.49	87.86	84.97	83.97	86.69	89.38	87.98	92.10	91.33	92.26	92.58	91.39	90.73	91.89	92.24	---										
OAC1150	88.65	88.43	88.08	88.89	88.37	87.63	85.51	80.04	86.53	88.16	88.37	87.55	84.80	84.15	86.73	88.01	87.43	91.39	91.11	91.84	91.22	90.80	90.25	91.46	91.22	99.39	---									
<i>E. etli</i>	88.54	88.54	88.80	88.62	88.37	88.09	85.83	80.63	87.24	87.62	88.74	87.80	84.84	83.81	86.68	88.52	85.79	90.32	90.44	91.56	91.18	91.05	89.92	91.28	92.26	93.02	92.86	---								
<i>R. alamii</i>	86.57	87.27	90.68	85.80	85.88	86.18	84.54	80.42	85.84	86.57	85.88	85.58	85.53	81.14	83.56	86.56	83.24	86.45	86.82	87.27	87.33	86.93	86.32	87.71	86.01	88.34	88.05	89.35	---							
<i>R. oryzae</i>	86.67	86.22	85.59	85.91	85.78	85.14	82.87	80.09	83.55	84.89	84.22	83.96	83.21	80.25	83.77	84.69	82.79	85.65	86.19	86.44	87.39	87.00	85.48	87.05	86.13	86.58	85.75	87.33	85.93	---						
<i>R. sullae</i>	91.40	91.18	87.78	88.12	89.37	87.87	86.56	82.69	86.16	87.78	88.46	88.14	87.15	85.14	86.61	90.93	87.02	89.27	88.83	89.37	88.29	88.34	87.86	87.96	88.61	86.56	86.19	88.69	85.96	84.97	---					
<i>R. multihospitium</i>	89.82	89.82	89.33	88.12	88.46	89.24	86.79	82.00	88.17	93.89	91.63	90.38	88.41	84.38	87.72	88.66	86.19	88.36	89.08	89.37	88.51	87.67	87.38	88.43	88.61	89.29	89.29	89.82	88.30	87.89	90.21	---				
<i>R. fabae</i>	89.30	89.30	89.95	87.43	87.91	88.00	85.44	80.56	86.70	88.84	89.30	88.28	84.68	84.42	85.78	88.31	85.71	91.08	93.00	93.26	90.74	90.78	90.50	91.21	91.80	91.10	91.42	90.93	88.44	87.56	88.22	90.00	---			
<i>R. pisi</i>	89.58	89.58	88.19	86.51	86.30	87.27	84.08	79.38	85.45	89.31	89.31	88.21	84.37	83.17	86.36	89.98	85.52	91.91	94.44	95.12	91.17	90.56	90.12	91.08	92.51	91.98	91.63	91.56	87.55	86.97	88.89	90.38	97.33	---		

Los nombres de las especies hacen referencia a las secuencias de las cepas tipo indicadas en el análisis filogenético

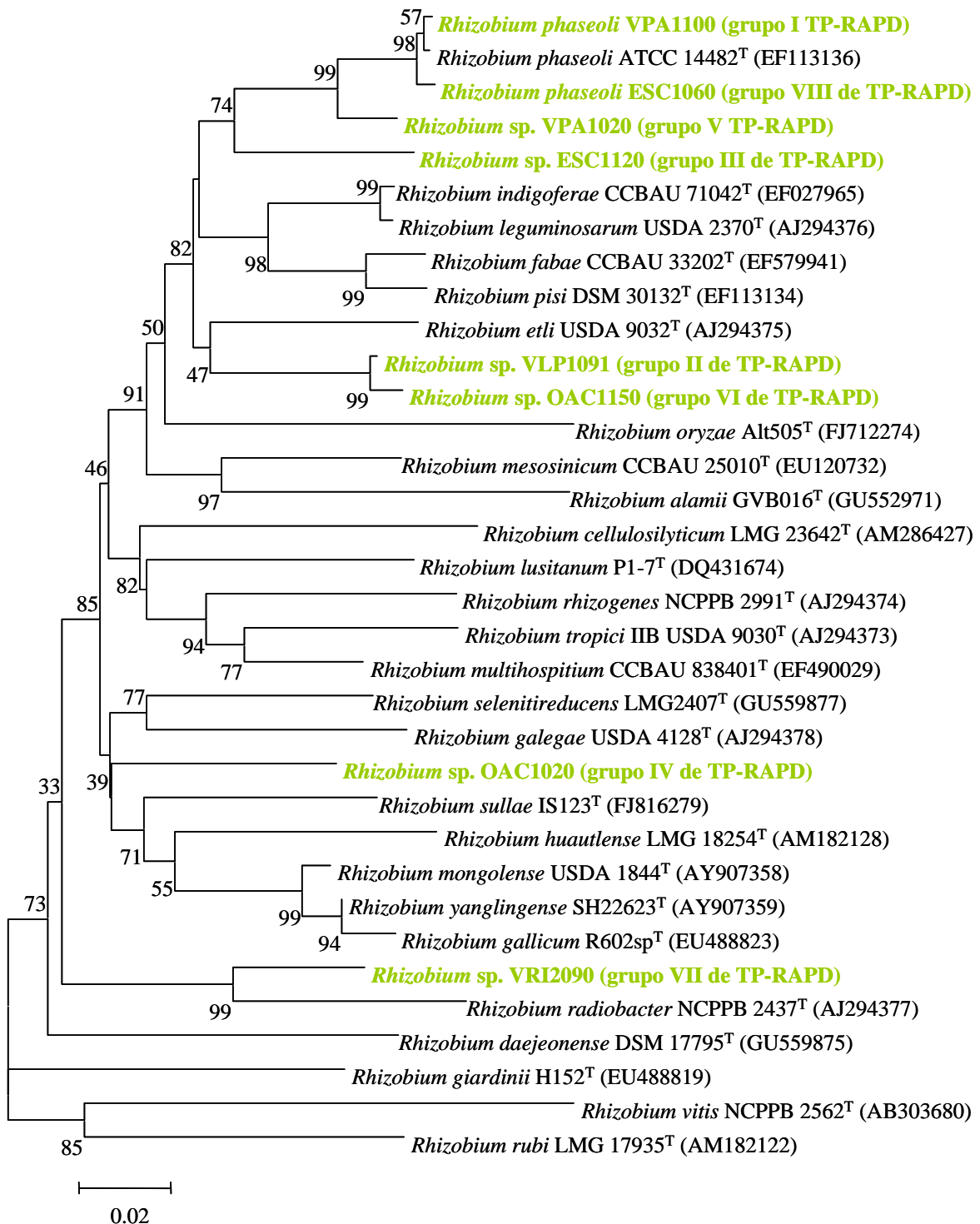


Figura 17. Análisis filogenético del gen *recA* de los aislados a partir de nódulos de *P. vulgaris* en este estudio y diferentes especies del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

4.3.5. Análisis de los genes *atpD* y *recA* concatenados

En los últimos años se están llevando a cabo numerosos estudios en los rhizobia analizando los genes housekeeping concatenados (MLSA o MLST) lo que permite mejorar el análisis filogenético y conseguir una mayor estabilidad en las posiciones filogenéticas de las especies (Martens *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2009; van Berkum *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta las incongruencias mostradas en algunas cepas de este estudio en el análisis independiente de los genes *recA* y *atpD*, se concatenaron sus secuencias para llevar a cabo su análisis filogenético. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18.

El análisis filogenético de los genes concatenados mostró mucho más claramente las posiciones filogenéticas de las cepas, sobre todo en aquéllos casos en los que dichas posiciones variaron dependiendo del gen analizado.

Las cepas de los grupos I y VIII fueron definitivamente identificadas como *R. phaseoli*. Las cepas del grupo III forma una agrupación con la especie *R. etli*, aunque no se puede concluir que pertenezca a esta especie, teniendo en cuenta la distancia filogenética existente entre ellas, que es inferior a la existente entre *R. pisi* y *R. leguminosarum*. Las cepas del grupo V fueron filogenéticamente más relacionadas con *R. leguminosarum* que con *R. phaseoli* pero, nuevamente, la distancia filogenética fue similar a la existente entre *R. pisi* y *R. leguminosarum* por lo que no se puede clasificar en ninguna de estas especies.

Las cepas representativas de los perfiles de TP-RAPD II, IV, VI y VII formaron un grupo pero con similitudes internas bajas, excepto en el caso de las cepas de los grupos II y VI que definitivamente pertenecen a la misma especie.

Por lo tanto, del análisis de los genes concatenados se puede concluir que las cepas aisladas en este estudio podrían pertenecer a varias especies no descritas del género *Rhizobium*, sin embargo las distancias filogenéticas existentes entre algunas de ellas están en el límite para la diferenciación de especies dentro de este género, que se ha estimado que deben de ser inferiores al 95% en ambos genes (Valverde *et al.*, 2006). En cualquier caso, para describir las posibles nuevas especies sería necesario que existieran diferencias fenotípicas con respecto a todas las especies cercanas del género *Rhizobium* y llevar a cabo estudios de hibridación del DNA total.

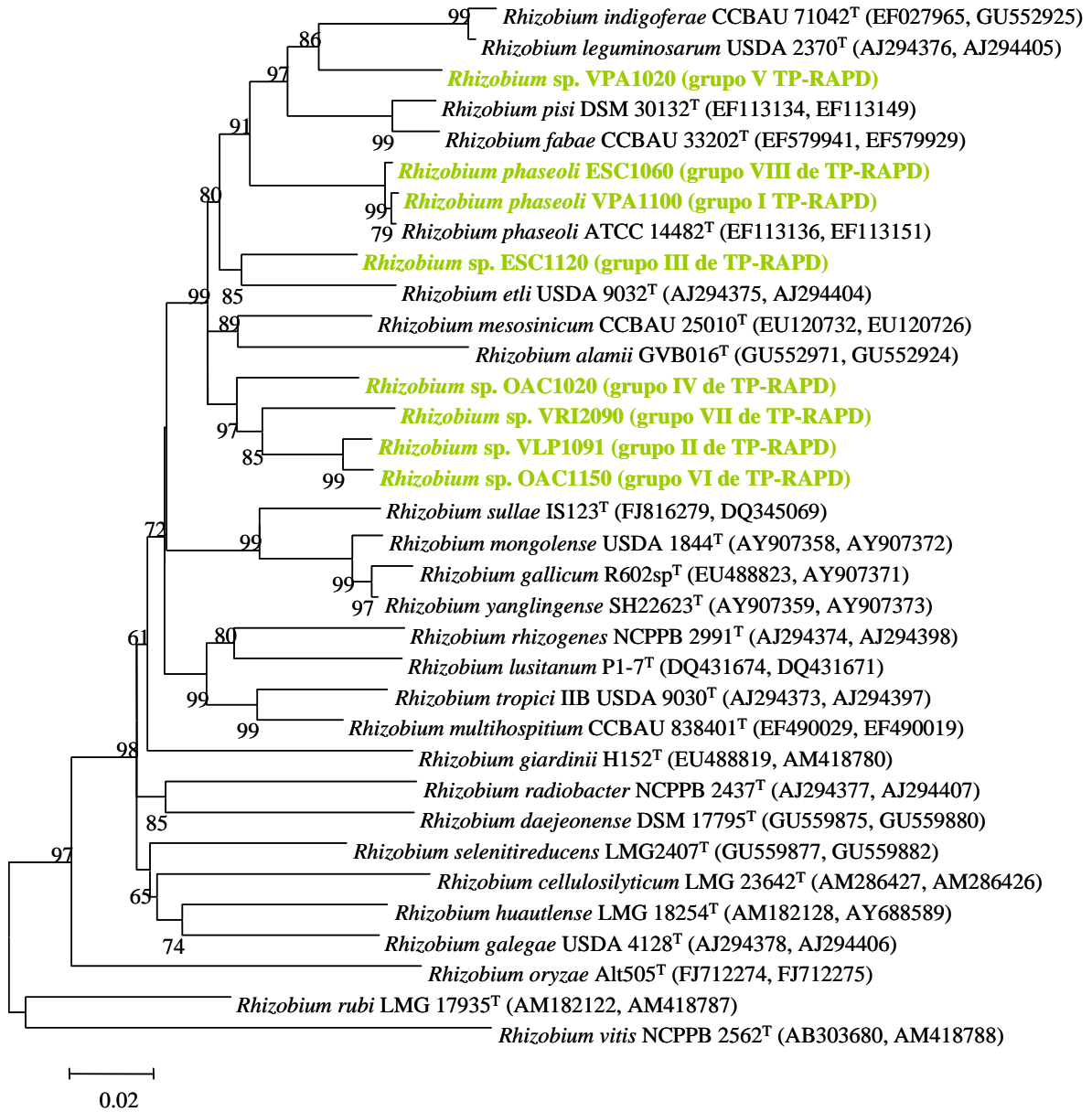


Figura 18. Análisis filogenético de los genes *recA* y *atpD* concatenados. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

4.4.1. Fisiología

4.4.1.1. Crecimiento a diferentes temperaturas, condiciones de pH y salinidad

La capacidad de los microorganismos para crecer en diferentes condiciones de cultivo puede variar ampliamente incluso entre cepas de la misma especie, sin embargo hay algunas características que pueden ser típicas de especie e incluso, cuando las condiciones son extremas, pueden diferenciar entre géneros o categorías superiores. En el caso de los rhizobia se han observado un gran número de diferencias entre cepas de un mismo género en cuanto a la tolerancia a temperaturas extremas (Amarger, 2001; De Lajudie *et al.*, 1994; Graham y Parker, 1964; Michiels *et al.*, 1994), acidez (Aarons y Graham, 1991; Graham y Parker, 1964; Graham *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1994) y salinidad (Bhardwaj, 1975; Méndez-Castro y Alexander, 1976).

La temperatura óptima de crecimiento de los rhizobia ronda los 28°C y todos los aislados de este estudio presentaron un crecimiento abundante a esta temperatura. Como podemos observar en la Tabla 22, todos los aislados también crecieron a 15°C y sólo algunos aislados presentaron crecimiento a 37°C, destacando aquéllos que presentaron el perfil III de TP-RAPD y la cepa VCS3090 que presentó el perfil I de TP-RAPD. Ninguno fue capaz de crecer a temperaturas superiores a 40°C ni inferiores a 10°C. Estos resultados indican que los aislados presentan un margen de temperaturas de crecimiento relativamente pequeño, lo cuál es habitual en los rhizobia de climas templados, dentro de los cuáles la mayoría no crecen a temperaturas cercanas a los 37°C que es una temperatura que ya permite establecer diferencias entre algunas especies del género *Rhizobium*, incluyendo aquéllas capaces de nodular *Phaseolus* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008). En nuestro caso, sólo las cepas que presentaron el perfil III de TP-RAPD crecieron generalmente a esta temperatura diferenciándose del resto de cepas del estudio, no obstante la cepa ESC1020 no creció a esta temperatura por lo que no es un carácter diferenciador entre los grupos de TP-RAPD hallados en este estudio.

El pH óptimo de crecimiento de los rhizobia está en torno a 7 aunque algunas cepas pueden crecer entre 6 y 8, por ello se analizó el crecimiento a pH 5, 6, 7 y 8. Como podemos apreciar en la Tabla 26, todas las cepas fueron capaces de crecer a pH 6 y 7. A pH 5 varias cepas mostraron un crecimiento débil. Estos resultados son comunes en los rhizobia aunque algunas veces se ha encontrado una cierta correlación entre el pH del suelo del que se aíslan las cepas y la tolerancia al pH en medio de cultivo en el caso de *P. vulgaris* (García-Fraile, 2008). En nuestro caso, algunas de las cepas que mostraron

crecimiento débil a pH 5 fueron aisladas de suelos con pH próximos a este valor, sin embargo la mayoría fueron aisladas de suelos con pH más alto, por lo que no se pueden correlacionar pH del suelo y tolerancia al pH *in vitro*. El crecimiento a pH 5 es un carácter diferenciador para las especies de *Rhizobium* que nodulan *Phaseolus* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008), sin embargo en este estudio no hemos encontrado diferencias entre los diferentes grupos de TP-RAPD.

En cuanto a la salinidad, los rhizobia no toleran altas concentraciones de sal y generalmente se encuentra variabilidad ya al 1% de NaCl, siendo capaces de crecer en el 0,5% de NaCl muchos de ellos. En la Tabla 26, se puede observar que todos los aislados presentaron crecimiento en esta concentración de sal y también, aunque el crecimiento fue débil en muchos casos, en el 1%, sin embargo en presencia de 1,5% de sal sólo crecieron algunos aislados y en 2 y 2,5% ninguno fue capaz de crecer. Estos resultados entran dentro de la normalidad, ya que los rhizobia habitualmente no crecen a concentraciones de NaCl superiores al 2% (Kuykendall, 2005).

4.4.1.2. Resistencia natural a antibióticos

El espectro de resistencia natural a antibióticos es una prueba habitual en la caracterización de los rhizobia aunque es una prueba con bajo valor taxonómico porque muchas veces la resistencia natural a antibióticos es codificada en plásmidos y se transfiere fácilmente de unas cepas a otras. Se han realizado numerosos trabajos sobre la tolerancia de los rhizobia a los antibióticos (Amarger, 2001; Cole y Elkan, 1979; Graham, 1963; Hagedorn, 1979). Desde las primeras investigaciones acerca de la resistencia natural a antibióticos de los rhizobia y su variación en diferentes aislados de *P. vulgaris* (Beynon y Josey, 1980; Josey *et al.*, 1979), esta prueba fenotípica ha sido ampliamente utilizada en estudios ecológicos para identificar cepas inoculadas y para determinar heterogeneidad en poblaciones naturales (Eaglesham, 1987). Además estas características se utilizan habitualmente en la descripción de especies del género *Rhizobium*, incluyendo aquellas que nodulan *Phaseolus* (Amarger *et al.*, 1997; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006).

La resistencia de los aislados a los antibióticos y concentraciones indicados en el correspondiente apartado de materiales y métodos, se muestra en la Tabla 26. Como se puede observar, el patrón de antibióticos fue bastante constante en todas los aislados, ya que todos ellos fueron resistentes a neomicina, eritromicina, cefuroxima y polimixina B y todas fueron sensibles a cloxacilina, tetraciclina y ciprofloxacina. La mayoría son sensibles a gentamicina. Sólo las cepas que presentaron el perfil de TP-RAPD IV fueron sensibles a la ampicilina y a la penicilina. Algunos antibióticos son muy útiles para diferenciación de

Tabla 26. Resultados de la caracterización fenotípica

Cepa	ASIMILACIÓN DE L-ARABINOSA	ASIMILACIÓN DE L-RAMNOSA	ASIMILACIÓN DE L-RIBOSA	ASIMILACIÓN DE L-SORBOSA	ASIMILACIÓN DE D-XILOSA	ASIMILACIÓN DE L-FRUCTOSA	ASIMILACIÓN DE L-GALACTOSA	ASIMILACIÓN DE D-GLUCOSA	ASIMILACIÓN DE D-MANOSA	ASIMILACIÓN DE CELOBIOSA	ASIMILACIÓN DE LACTOSA	ASIMILACIÓN DE MALTOSA	ASIMILACIÓN DE MELIBIOSA	ASIMILACIÓN DE SACAROSA	ASIMILACIÓN DE TREHALOSA	ASIMILACIÓN DE MELICITOSA	ASIMILACIÓN DE RAFINOSA	ASIMILACIÓN DE SALICINA
VPA1100	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VPA1010	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
OLQ1051	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	W
OLQ1052	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	W
VRI2100	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W
VAR1140	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
VCS3090	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
OLQ1040	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	W
VLP1091	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W
ESC1020	+	W	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	W
ESC1110	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
ESC1120	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
ESC1150	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
VCS3080	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
OAC1020	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
OAC1031	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
OAC1140	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
VCS3041	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
VPA1020	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ELF1060	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
OAC1150	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
VRI2090	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ESC1060	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	W
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-
<i>R. giardinii</i> H152 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W
<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	W
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. multihospitium</i> CCBAU83401 ^T	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 26 (continuación)

Cepa	ASIMILACIÓN DE BETAINA	ASIMILACIÓN DE SARCOSINA	ASIMILACIÓN DE ADONITOL	ASIMILACIÓN DE ERITRITOL	ASIMILACIÓN DE INOSITOL	ASIMILACIÓN DE MANITOL	ASIMILACIÓN DE XILITOL	ASIMILACIÓN DE L-ALANINA	ASIMILACIÓN DE L-ARGININA	ASIMILACIÓN DE L-ASPARTATO	ASIMILACIÓN DE L-GLUTAMATO	ASIMILACIÓN DE L-HISTIDINA	ASIMILACIÓN DE L-METIONINA	ASIMILACIÓN DE L-LEUCINA	ASIMILACIÓN DE L-LISINA	ASIMILACIÓN DE L-ORNITINA	ASIMILACIÓN DE L-PROLINA
VPA1100	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VPA1010	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
OLQ1051	+	+	+	w	+	+	+	-	-	+	-	w	-	-	-	-	+
OLQ1052	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
VRI2100	+	+	-	-	+	+	+	-	-	w	+	-	-	-	-	-	+
VAR1140	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VCS3090	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
OLQ1040	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VLP1091	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ESC1020	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ESC1110	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	w	-	-	-	-	+
ESC1120	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	w	-	-	-	-	+
ESC1150	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VCS3080	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
OAC1020	+	w	-	-	+	+	+	-	-	-	+	w	-	-	-	-	+
OAC1031	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	w	-	-	-	-	+
OAC1140	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	w	-	-	-	-	+
VCS3041	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	w	-	-	-	-	+
VPA1020	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
ELF1060	+	+	+	-	+	+	+	w	-	+	+	+	-	-	-	-	+
OAC1150	+	+	+	-	+	+	+	w	-	+	+	+	-	-	-	-	+
VRI2090	+	w	+	-	+	+	+	w	-	+	+	+	-	-	-	-	+
ESC1060	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	w	-	-	-	-	+
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	+	+	+	w	+	+	+	w	w	w	+	+	-	+	-	-	+
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	+	-	+	w	+	+	+	+	+	w	+	+	-	+	-	-	+
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	+	-	+	w	+	+	+	+	w	+	+	w	-	+	-	-	+
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	w	-	-	-	-	+
<i>R. giardinii</i> H152 ^T	+	+	+	w	+	+	+	+	-	w	+	w	-	w	-	-	+
<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	+	+	+	w	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	+	-	+	w	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	+	+	+	w	+	+	+	+	+	w	+	+	-	+	+	+	+
<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	+	+	+	-	+	+	+	-	w	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>R. multihospitium</i> CCBAU83401 ^T	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 26 (continuación)

Cepa	ASIMILACIÓN DE L-SERINA	ASIMILACIÓN DE L-VALINA	ASIMILACIÓN DE CITRATO	ASIMILACIÓN DE GLUCONATO	ASIMILACIÓN DE GLUCURONATO	ASIMILACIÓN DE GLUTARATO	ASIMILACIÓN DE PIRUVATO	ASIMILACIÓN DE PROPIONATO	CRECIMIENTO A pH 5	CRECIMIENTO A pH 6	CRECIMIENTO A pH 7	CRECIMIENTO A pH 8	CRECIMIENTO EN 0,5% NaCl	CRECIMIENTO EN 1% NaCl	CRECIMIENTO EN 1,5% NaCl	CRECIMIENTO EN 2% NaCl	CRECIMIENTO EN 2,5% NaCl
VPA1100	-	-	-	w	-	-	-	-	w	+	+	-	+	w	-	-	-
VPA1010	-	-	-	w	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
OLQ1051	-	-	-	w	-	-	-	-	w	+	+	-	+	w	w	-	-
OLQ1052	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	w	-	-	-
VRI2100	-	-	-	-	-	-	+	-	w	+	+	-	+	+	+	-	-
VAR1140	-	-	-	w	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	w	-	-
VCS3090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
OLQ1040	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	-	+	w	-	-	-
VLP1091	-	-	-	w	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	-	-	-
ESC1020	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	-	+	-	-	-	-
ESC1110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
ESC1120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
ESC1150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
VCS3080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
OAC1020	-	-	-	+	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	-	-	-
OAC1031	-	-	-	w	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
OAC1140	-	-	-	w	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
VCS3041	-	-	-	+	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	-	-	-
VPA1020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
ELF1060	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	-	-	-
OAC1150	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	-	-	-
VRI2090	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	-	-	-
ESC1060	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	w	-	-	-
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	-	-	+	+	w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	-	-	-	w	-	-	-	-	w	+	+	w	+	+	w	-	-
<i>R. giardinii</i> H152 ^T	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	w
<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	-	-	-	-	w	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	+	-	+	+	w	w	+	-	+	+	+	+	+	+	w	-	-
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	+	-	-	+	w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	-	-	+	+	w	w	+	-	+	+	+	w	+	+	+	-	-
<i>R. multihospitium</i> CCBAU83401 ^T	+	-	+	+	w	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 26 (continuación)

Cepa	CRECIMIENTO A 5°C	CRECIMIENTO A 15°C	CRECIMIENTO A 28°C	CRECIMIENTO A 37°C	CRECIMIENTO A 45°C	RESISTENCIA A CLOXACILINA	RESISTENCIA A TETRACICLINA	RESISTENCIA A NEOMICINA	RESISTENCIA A ERITROMICINA	RESISTENCIA A AMPICILINA	RESISTENCIA A GENTAMICINA	RESISTENCIA A CIPROFLOXACINA	RESISTENCIA A PENICILINA	RESISTENCIA A CEFUOXIMA	RESISTENCIA A POLIMIXINA B
VPA1100	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
VPA1010	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
OLQ1051	-	+	+	-	-	-	-	w	+	+	-	-	+	+	+
OLQ1052	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
VRI2100	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
VAR1140	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	w	-	+	+	+
VCS3090	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
OLQ1040	-	+	+	-	-	-	-	w	+	+	w	-	+	+	+
VLP1091	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ESC1020	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ESC1110	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ESC1120	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ESC1150	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
VCS3080	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
OAC1020	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAC1031	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAC1140	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
VCS3041	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
VPA1020	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ELF1060	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
OAC1150	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
VRI2090	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ESC1060	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	-	+	+	-	-	+	-	w	+	+	-	-	+	+	+
<i>R. etli</i> CFN42 ^T	-	+	+	-	-	-	-	w	+	-	-	-	-	+	w
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	w	-	+	+	+
<i>R. giardinii</i> H152 ^T	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	w	-	+	+	+
<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	w
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	-	+	+	-	-	w	w	w	w	w	-	-	-	w	+
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	w	-	+	+	+
<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	-	+	+	-	-	+	+	w	+	+	-	-	+	+	+
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	-	+	+	-	-	+	-	w	+	+	-	-	+	+	+

+: Presencia de crecimiento. -: Ausencia de crecimiento. w: Crecimiento débil.

especies (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) y en algunos casos también para analizar la diversidad intraespecífica puesto que dentro de la misma especie se pueden hallar resultados variables. En nuestro caso no hemos encontrado variabilidad dentro de un mismo grupo de TP-RAPD, aunque sí entre grupos de TP-RAPD diferentes, destacando el grupo IV que presentó claras diferencias en la resistencia a penicilina y ampicilina con respecto al resto de los grupos.

4.4.1.3. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno

Los rhizobia son quimiorganotrofos que pueden utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono y de nitrógeno para crecer. El espectro de componentes que pueden ser metabolizados parece dependiente de cepa y puede reflejar diferencias de adaptación a la rizosfera de la leguminosa o a los componentes orgánicos del suelo, teniendo esta variación entre los aislados implicaciones ecológicas (Amarger, 2001).

Los resultados de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno se muestran en la Tabla 26. Todas las cepas aisladas fueron capaces de utilizar casi todas las fuentes de carbono de tipo glucídico, tanto azúcares como polialcoholes. Sólomente fue variable la asimilación de L-sorbosa y de melicitosa entre los azúcares y de los polialcoholes, el eritritol sólo fue asimilado por la cepa VPA1020. En cuanto a los ácidos orgánicos, prácticamente ninguno de los incluidos en este estudio fueron utilizados como fuente de C, sólo el gluconato dio resultados variables. El citrato, glucuronato, glutarato, propionato y piruvato dieron resultados negativos en todas las cepas.

En cuanto a los aminoácidos y compuestos derivados fueron utilizados por todas las cepas como fuentes de C y de N el L-aspartato, la L-prolina y la betaína. Ningún aislado fue capaz de asimilar la L-alanina, la L-arginina, la L-metionina, la L-leucina, la L-lisina, la L-ornitina, la L-serina ni la L-valina. La utilización de sarcosina, L-glutamato y L-histidina fue variable.

La asimilación de fuentes de C de tipo glucídico como el eritritol, los ácidos orgánicos como el citrato y el piruvato y algunos aminoácidos como la L-serina han mostrado su utilidad para diferenciar especies del género *Rhizobium* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008). De acuerdo con nuestros resultados, ninguna de las fuentes de carbono y de carbono y nitrógeno analizadas en este estudio mostró diferencias claras entre los diferentes grupos de TP-RAPD lo cuál es muy habitual en cepas que se han aislado de ecosistemas muy próximos.

4.4.1.4. Agrupamiento fenotípico

Los datos fenotípicos pueden compararse utilizando métodos matemáticos que permiten el análisis de un gran número de caracteres, obteniendo como resultado el grado de similitud de los organismos analizados. Este sistema de agrupamiento se conoce como Taxonomía Numérica (Sneath y Socal, 1973; Sneath, 2001).

Los resultados del análisis matemático de los datos fenotípicos obtenidos en este estudio se muestran en la Figura 19. De acuerdo con estos resultados las cepas aisladas a partir de *P. vulgaris* en República Dominicana forman un gran grupo con un porcentaje de similitud cercano al 80%. Dentro de este grupo también se encuentran las cepas tipo de las especies *R. phaseoli* ATCC 14482^T y *R. etli* CFN42^T. Estos resultados son interesantes ya que ambas especies son los dos endosimbiontes americanos típicos de *P. vulgaris*.

Las cepas aisladas en este estudio se distribuyen en varios subgrupos que no tienen relación con el suelo de origen aunque algunas parejas de cepas aisladas en el mismo suelo presentaron idéntico perfil fenotípico, como ocurre en el caso de las cepas OAC1031 y OAC1140, que además presentaron el mismo perfil de TP-RAPD (perfil IV), al igual que ocurre en el caso de las cepas ESC1120 y ESC1110 (perfil III). Las cepas VCS3080 y VCS3081, aunque presentaron el mismo perfil fenotípico, su perfil de TP-RAPD fue diferente. Sólo en el caso de las cepas OAC1150 y ELF1060 el perfil fenotípico fue el mismo procediendo de distinto suelo.

No hubo una correlación clara entre la agrupación por perfiles fenotípicos y la agrupación por perfiles de TP-RAPD excepto en el caso de las cepas que presentaron el perfil IV que formaron un grupo con una similitud fenotípica cercana al 90%. En el resto de los casos, las cepas con un mismo perfil de TP-RAPD se distribuyeron en diferentes subgrupos fenotípicos que, por lo tanto, contenían cepas con varios perfiles de TP-RAPD.

Estos resultados son coherentes con el hecho de que los aislados de este estudio proceden de la misma región aunque los suelos tengan diferencias edáficas y químicas, pero otros factores como el clima y las condiciones ambientales son parecidas lo que también explica la gran similitud con las especies americanas *R. etli* y *R. phaseoli*. La similitud presentada entre estas cepas es muy cercana a la que pueden presentar cepas de la misma especie (80%) lo que indica la dificultad para distinguir fenotípicamente las especies de este grupo. De hecho en el trabajo de Ramírez-Bahena *et al.* (2008), las especies *R. etli* y *R. phaseoli* sólo se diferencian fenotípicamente de un modo claro en dos características. Esto pone de manifiesto la dificultad para describir especies nuevas dentro este grupo, aunque las diferencias genotípicas sean evidentes.

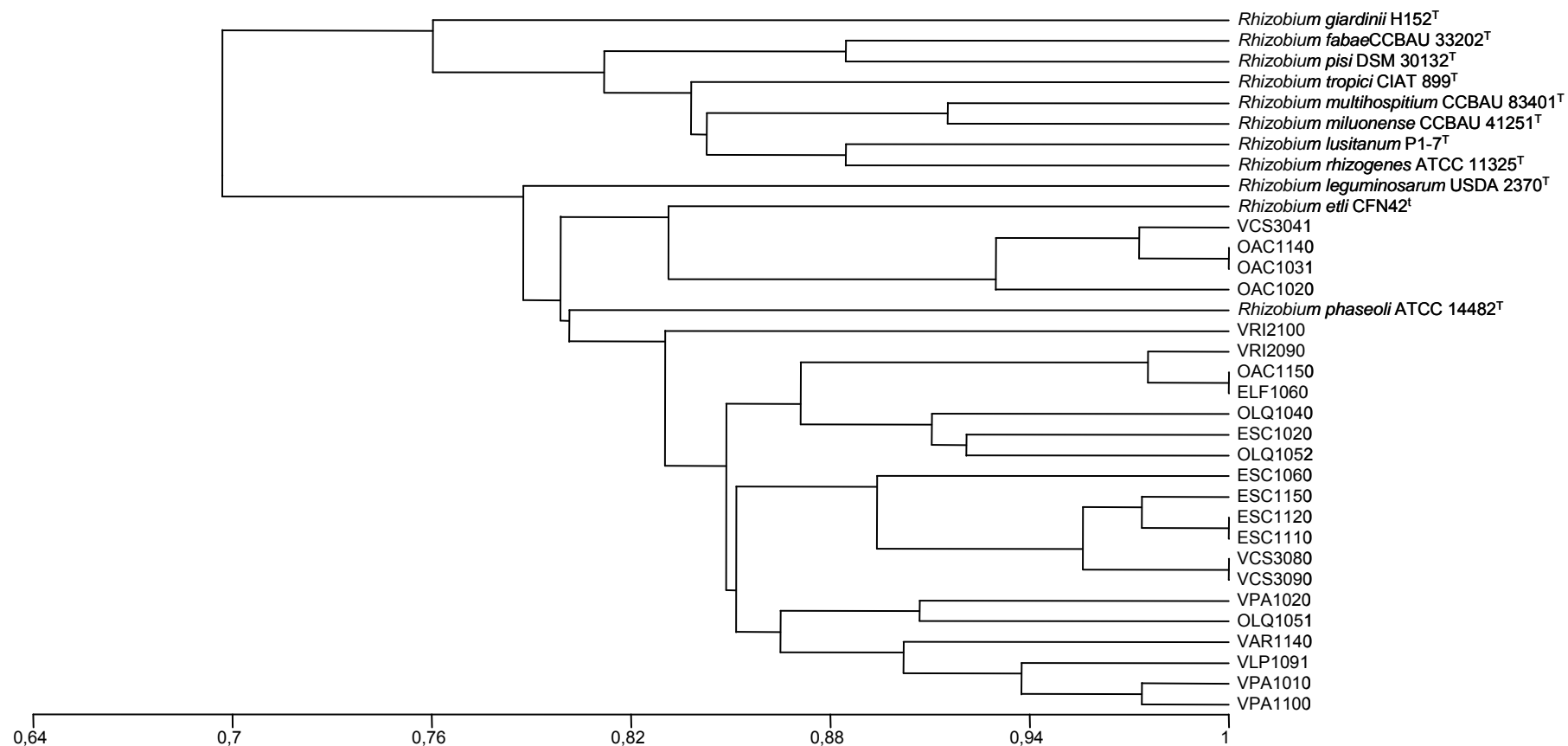


Figura 19. Dendrograma resultante del análisis de pruebas fenotípicas de las cepas del estudio y cepas de referencia.

4.5. CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA

4.5.1. Secuenciación y análisis filogenético del gen *nodC*

Los genes cromosómicos denominados en inglés “core” genes son los únicos válidos en estudios taxonómicos, sin embargo, en el caso de los rhizobia, los genes simbióticos y, especialmente, los que codifican para factores de nodulación son muy útiles para establecer el rango de hospedador y definir biovariedades dentro de una misma especie (Laguerre *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2007). Además son buenos marcadores de la coevolución de los rizobios con su hospedador (Álvarez Martínez *et al.*, 2009) así como de su origen biogeográfico (Aguilar *et al.*, 2004).

Los genes de nodulación (*nod*), inducidos por los flavonoides de las plantas, codifican la síntesis de factores nod, principales moléculas de la nodulación (Perret *et al.*, 2000). Los genes *nod* han evolucionado en función de la especie de leguminosa hospedadora para alcanzar una óptima nodulación (Broughton y Perret, 1999; Dobert *et al.*, 1994) y su filogenia se puede correlacionar con el rango de hospedador de la planta, como se ha descrito para los *nodB* (Wei *et al.*, 2003) y *nodC* (García-Fraile *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2007; Velázquez *et al.*, 2010; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2009).

El gen *nodC* es esencial en la capacidad para nodular de todas las especies de rhizobia de crecimiento rápido investigadas hasta el momento (Laguerre *et al.*, 2001) y codifica para una N-acetil-glucosaminil-transferasa implicada en el primer paso de la síntesis de los factores de nodulación. El gen *nodC* está implicado en la especificidad de hospedador y su análisis filogenético ofrece información sobre la promiscuidad de los mismos (Iglesias *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2007). Por lo tanto, actualmente las biovariedades de las especies de rhizobia se están empezando a definir en función de la secuencia de este gen (Iglesias *et al.*, 2007; Mnasri *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2007). En este sentido las cepas aisladas de nódulos de *Phaseolus* se han clasificado en las biovariedades denominadas phaseoli de las especies *R. giardinii*, *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997), *R. etli* (Wang *et al.*, 1999a) y *R. phaseoli* (García-Fraile *et al.*, 2010), en las biovariedades gallicum y giardinii de las especies *R. gallicum* y *R. giardinii* (Amarger *et al.*, 1997) y, finalmente, en una biovariedad de las especies *S. meliloti* y *S. fredii* denominada mediterraneanse (Mnasri *et al.*, 2007; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2009).

Este gen se secuenció en cepas representativas de diferentes grupos filogenéticos y los resultados se muestran en la Figura 20 y en la Tabla 27. En ellas se observa que todas las cepas de este estudio se agrupan con cepas de la biovariedad phaseoli de diversas especies de *Rhizobium*. Estos resultados concuerdan con los de los estudios realizados por otros

autores (García-Fraile *et al.*, 2010; Laguerre *et al.*; 2001) sugiriendo que los genes *nodC* de las cepas capaces de nodular *Phaseolus* evolucionaron a partir de un ancestro común.

Las cepas aisladas en República Dominicana se distribuyeron en dos grupos de acuerdo con los resultados del análisis filogenético del gen *nodC*. Las cepas ESC1120 y VPA1020, representativas de los grupos III y V de TP-RAPD, respectivamente mostraron mayor similitud con la cepa *R. etli* Viking I, con similitudes superiores al 99,4% que con las cepas tipo de las especies *R. etli* o *R. phaseoli*, con similitudes inferiores al 96,5%. El resto de las cepas analizadas, VLP1091, OAC1150, OAC1020 y ESC1060, fueron más próximas a estas dos últimas cepas con similitudes superiores al 97,9%. En cualquier caso la biovariedad *phaseoli* de las especies del género *Rhizobium* forma un grupo muy compacto con una similitud interna superior al 95% y se separa claramente de otras biovariedades que también nodulan *Phaseolus* como la biovariedad mediterránea, la biovariedad *gallicum* o la biovariedad *giardinii*.

Los aislados de este estudio presentan dos alelos del gen *nodC*, □ y □, que corresponden a los alelos de *R. etli* hallados por Aguilar *et al.* (2004) en cepas de esta especie en América y en aislados del Sur de España (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). También son los dos alelos encontrados recientemente en cepas aisladas a partir de *P. vulgaris* en el Norte de España (García-Fraile *et al.*, 2010), aunque en este caso ligados a cepas que no pertenecen a *R. etli*. Estos resultados sugieren que los genes *nodC* presentes en las cepas dominicanas, al igual que sucede en las cepas españolas, fueron adquiridos a partir de cepas americanas y resultan de gran interés para futuros estudios de biogeografía.

Nuestros resultados además confirman que las filogenias construidas con los genes simbióticos son incongruentes con las filogenias del gen ribosómico 16S y de los genes “housekeeping”. En las filogenias de los genes *nodC* se pueden observar agrupaciones en el mismo clado de cepas que de acuerdo con las de los genes ribosómicos 16S pertenecen a especies e incluso géneros diferentes. Este hecho apoya la hipótesis de la transferencia horizontal de genes simbióticos (Bailly *et al.*, 2007; Gogarten y Townsend, 2005; Sørensen *et al.*, 2005), como ya se ha demostrado en simbioses de *Medicago* (Bailly *et al.*, 2007), entre cepas indígenas de Brasil y *B. japonicum* de otras localizaciones (Gomes-Barcellos, 2007) o en cepas oriundas de Nueva Zelanda y cepas foráneas de *M. loti* aisladas de *Lotus corniculatus* (Sullivan *et al.*, 1995). La transferencia de genes está facilitada por el hecho de que en las especies de crecimiento rápido los genes simbióticos están localizados en plásmidos o elementos fácilmente transponibles de unas bacterias a otras en la rizosfera (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Uchiumi *et al.*, 2004).

El hecho de que todas las cepas de la biovariedad *phaseoli* de diferentes orígenes geográficos (América y Europa) sean tan próximas filogenéticamente indica que posiblemente los genes simbióticos tienen el mismo origen filogenético y fueron transferidos de unas

especies a otras a partir de una especie donadora que posiblemente adquirió estos genes en coevolución con el hospedador en sus centros de distribución en América y al ser exportada la alubia desde éstos a otros continentes los genes simbióticos fueron dispersados y adquiridos por especies autóctonas.

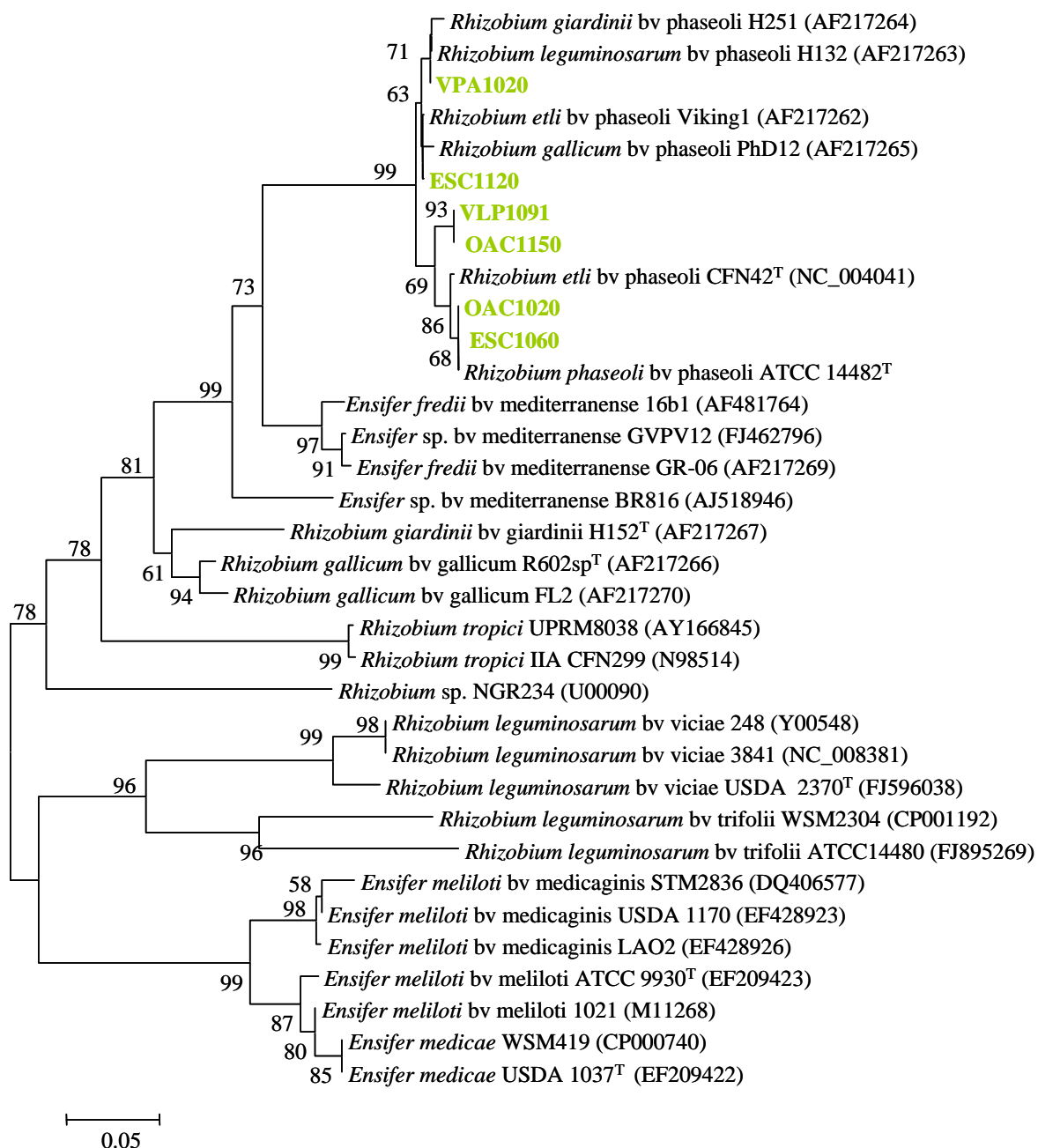


Figura 20. Análisis filogenético de los genes *nodC*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

Tabla 27. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen *nodC*

	VPA1020	R. giardinii H251	R. e11i Viking I	R. leguminosarum bv phaseoli H132	R. leguminosarum bv phaseoli pHD12	VLP1091	OAC1150	OAC1020	ESC1060	R. phaseoli ATCC 14482 ^T	R. e11i bv phaseoli CFN42 ^T	ESC1120	Ensifer sp. Br816	E. melloti GV12	E. fredii bv mediterraneense GR-06	E. fredii bv mediterraneense 16b1	R. gallicum bv gallicum R602sp	R. gallicum bv gallicum FL27	R. giardinii bv giardinii H152	R. tropici UPRM8038	R. tropici IIA CFN299	Rhizobium sp. NGR234	R. leguminosarum bv trifolii WSM2304	R. leguminosarum bv trifolii ATCC14480	R. leguminosarum 2481	R. leguminosarum bv viciae USDA2370	E. medicae WSM419	E. medicae USDA 1097	E. melloti ATCC 9930	E. melloti 1021	E. melloti bv medicaginis STM2836	E. melloti bv medicaginis LAO2	E. melloti bv medicaginis USDA1170		
VPA1020	--																																		
R. giardinii bv phaseoli H251	99.50	--																																	
R. e11i bv phaseoli Viking I	99.39	99.00	--																																
R. leguminosarum bv phaseoli H132	99.88	99.50	99.41	--																															
R. leguminosarum bv phaseoli pHD12	98.21	98.14	98.81	98.70	--																														
VLP1091	97.55	97.31	97.81	97.84	97.85	--																													
OAC1150	97.55	97.31	97.81	97.84	97.85	100.00	--																												
OAC1020	96.44	96.14	96.02	96.06	96.08	97.85	97.85	--																											
ESC1060	96.44	96.14	96.02	96.06	96.08	97.85	97.85	100.00	--																										
R. phaseoli ATCC 14482 ^T	96.63	96.16	96.56	96.45	96.77	97.86	97.86	100.00	100.00	--																									
R. e11i bv phaseoli CFN42 ^T	96.19	96.29	96.80	96.69	97.13	98.29	98.29	99.22	99.22	99.54	--																								
ESC1120	98.97	98.87	99.55	98.66	98.68	97.77	97.77	96.46	96.46	96.07	96.51	--																							
Ensifer sp. Br816	84.15	84.65	85.05	85.33	85.42	86.32	86.32	85.55	85.55	84.81	78.83	87.34	--																						
E. melloti GV12	87.00	87.00	86.33	86.19	86.92	83.33	83.33	84.80	84.80	87.51	87.75	82.73	89.38	--																					
E. fredii bv mediterraneense GR-06	87.21	87.30	87.58	87.33	87.95	86.76	86.76	88.00	88.00	88.81	88.93	86.67	90.41	99.51	--																				
E. fredii bv mediterraneense 16b1	87.66	87.76	88.14	87.78	88.26	85.39	85.39	86.78	86.78	88.77	89.01	86.32	89.38	94.38	94.13	--																			
R. gallicum bv gallicum R602sp	83.43	84.28	83.27	83.08	83.12	76.92	76.92	77.73	77.73	82.62	83.07	78.60	86.71	86.46	87.82	87.79	--																		
R. gallicum bv gallicum FL27	82.98	83.10	83.00	83.00	83.13	80.09	80.09	79.50	79.50	83.15	83.39	81.34	87.21	87.07	87.09	87.45	96.43	--																	
R. giardinii bv giardinii H152	82.36	82.55	81.97	81.66	81.63	76.07	76.07	76.17	76.17	81.01	81.77	77.29	83.50	83.66	84.99	84.74	90.39	90.77	--																
R. tropici UPRM8038	75.00	75.07	74.59	74.84	74.97	73.39	73.39	71.78	71.78	74.62	74.87	72.99	75.89	77.00	77.17	76.65	78.93	78.98	75.25	--															
R. tropici IIA CFN299	76.04	76.24	75.56	75.62	75.77	71.37	71.37	70.31	70.31	75.60	70.12	70.74	74.47	77.83	78.23	77.90	80.06	79.83	76.59	98.22	--														
Rhizobium sp. NGR234	74.61	75.25	74.97	74.67	75.32	69.23	69.23	69.92	69.92	74.45	71.98	69.00	73.59	77.25	78.47	78.51	80.28	80.32	78.43	73.98	71.58	--													
R. leguminosarum bv trifolii WSM2304	68.96	68.73	69.29	68.92	69.84	65.02	65.02	66.52	66.52	70.33	70.33	65.98	72.14	72.26	72.26	71.79	73.58	72.81	71.41	70.30	71.53	72.38	82.63	--											
R. leguminosarum bv trifolii ATCC14480	71.05	71.68	70.83	70.43	70.85	61.47	61.47	60.87	60.87	70.67	66.67	62.83	69.88	72.72	73.95	73.65	75.16	75.93	75.00	72.10	69.88	69.82	72.31	75.54	--										
R. leguminosarum 2481	71.04	71.66	70.82	70.41	70.84	61.54	61.54	60.94	60.94	70.66	66.59	62.88	69.80	72.70	73.92	73.63	75.24	76.01	74.97	72.21	69.87	69.81	72.30	75.63	99.92										
R. leguminosarum bv viciae USDA2370 ^T	72.06	72.28	71.83	71.67	71.99	64.49	64.49	63.40	63.40	72.12	72.22	65.85	74.00	73.52	73.77	74.63	76.60	76.76	75.53	71.96	73.05	75.30	75.77	76.33	96.09	--									
E. medicae WSM419	72.35	72.52	71.65	71.60	72.22	63.68	63.68	64.84	64.84	72.84	67.92	63.76	70.88	73.98	75.28	75.21	78.03	79.09	75.40	73.60	71.12	72.62	66.82	73.10	72.16	75.53	--								
E. medicae USDA 1097	72.68	72.44	72.63	73.13	73.13	66.99	66.99	66.96	66.96	74.00	73.88	67.51	74.38	75.50	75.41	75.75	78.88	79.25	76.13	74.13	75.13	76.25	70.13	72.40	75.28	75.59	100.00	--							
E. melloti ATCC 9930	72.55	72.52	71.85	71.80	72.43	65.52	65.52	66.27	66.27	73.12	72.84	65.78	73.07	73.71	74.91	74.85	77.68	78.47	75.26	73.35	73.65	74.57	69.04	72.14	73.67	74.23	96.43	96.75	--						
E. melloti 1021	72.35	72.52	71.89	71.83	72.33	64.96	64.96	66.02	66.02	72.84	67.84	65.07	70.73	73.51	74.91	75.09	77.92	78.60	75.19	73.35	71.12	72.30	65.96	71.41	71.69	74.70	96.88	96.63	95.17	--					
E. melloti bv medicaginis STM2836	74.75	75.13	73.46	73.18	72.96	65.81	65.81	67.19	67.19	73.61	70.83	65.07	73.77	74.58	76.77	75.54	80.24	76.54	73.79	71.81	74.19	68.16	73.67	73.10	77.34	92.43	92.71	90.38	92.57	--					
E. melloti bv medicaginis LAO2	72.23	72.52	71.65	71.60	72.33	66.24	66.24	67.58	67.58	72.96	67.78	65.50	70.44	73.51	74.54	74.36	77.17	78.72	74.76	72.97	70.83	71.90	66.28	71.29	70.67	74.47	89.77	91.25	89.30	89.70	98.32	--			
E. melloti bv medicaginis USDA1170	72.23	72.52	71.77	71.72	72.45	66.67	66.67	67.97	67.97	72.96	67.60	65.94	70.49	73.86	74.91	74.73	77.49	78.84	74.87	72.84	70.65	72.06	67.45	71.77	72.08	74.94	91.41	91.63	89.76	91.26	98.60	97.51	100		

4.6. EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA EN MEDIO HIDROPÓNICO LIBRE DE NITRÓGENO Y CONDICIONES DE ESTERILIDAD

Todos los aislados fueron sometidos al análisis de la efectividad simbiótica, consistente en la inoculación de 16 plantas con cada aislado, comparando el crecimiento observado con el de dos testigos no inoculados, regados respectivamente con la solución libre de nitrógeno y suplementada con nitrógeno. El período de crecimiento fue de 35 días, por lo que las plantas apenas estaban iniciando el estado fenológico de floración, y la efectividad simbiótica se determinó midiendo la producción de biomasa aérea y la acumulación de nitrógeno de procedencia simbiótica en dicha biomasa. De los 23 aislados, 17 reinfectaron el 100% de las plantas inoculadas (Tabla 28) y con ellos se realizó el estudio estadístico de los resultados obtenidos. Los otros 6 aislados produjeron una nodulación errática en las plantas huésped, pues solo aparecieron nódulos en algunas de las plantas inoculadas. En estos casos se repitió en ensayo dos veces con los mismos resultados erráticos de nodulación. Varias pueden ser las causas de una nodulación errática, aunque son más frecuentes en condiciones de campo que en condiciones hidropónicas. En primer lugar, existe una importante interacción entre el cultivar y el microsimbionte (Rodríguez Navarro *et al.*, 1999). Otro aspecto clave es el número de rizobios, pues un número bajo afecta de manera muy importante a la nodulación (Drevon *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2004). En campo, pueden existir interacciones más o menos complejas entre el genotipo de la planta huésped y los rizobios nativos del suelo. También tiene importancia el tamaño de las poblaciones de rizobios en el suelo, y puede existir influencia negativa de factores ambientales, o de algunas prácticas agronómicas (Drevon *et al.*, 2001). Sin embargo, en

Tabla 28. Capacidad de reinfeción de los 23 aislados

Cepas	Reinfeción completa (en todas las plantas)	Reinfeción errática
ELF1060		x
ESC1020	x	
ESC1060	x	
ESC1110	x	
ESC1120	x	
ESC1150		x
OAC1020	x	
OAC1031		x
OAC1140	x	
OAC1150	x	
OLQ1040		x
OLQ1051	x	
OLQ1052	x	
VAR1140	x	
VCS3041	x	
VCS3080		x
VCS3090	x	
VLP1091	x	
VPA1010	x	
VPA1020	x	
VPA1100	x	
VRI 2100		x
VRI2090	x	

condiciones hidropónicas, y teniendo en cuenta que todas las cepas pertenecen al mismo biovar, phaseoli, e idéntico nodC la causa podría estar en una deficiente unión a la raíz, lo cual precisaría un estudio en profundidad del proceso de infección de las cepas.

Las variables dependientes determinadas al cabo de los 35 días de cultivo fueron la biomasa aérea, la biomasa de las raíces, concentración de nitrógeno Kjeldahl en la biomasa aérea (porcentaje) y contenido total de nitrógeno en la misma. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (Tabla 29), observando que para todas las variables dependientes existen diferencias significativas a un nivel de $p < 0,001$.

Tabla 29. Resultados del ANOVA de las variables dependientes analizadas en el experimento de inoculación de habichuela roja José Beta en el experimento hidropónico.

Variable	Suma cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p
Biomasa aérea	2,989 10 ⁷	21	1,423 10 ⁷	332,699	0,000
Biomasa subterránea	1,146 10 ⁷	21	545499,526	228,917	0,000
N (%) en biomasa aérea	613,307	21	29,205	422,307	0,000
N total en biomasa aérea	32212,331	21	1533,921	251,160	0,000

En las Tablas (30 y 31) se presenta la comparación de los valores medios para cada una de las variables dependientes, basada en la prueba *post hoc* de la Diferencia Mínima Significativa (DMS). La variable independiente es el tratamiento de inoculación, considerando los 17 aislados y los controles sin inocular regados con solución sin nitrógeno. La información contenida en ambas tablas es la misma, pero están ordenadas de diferente forma, y para la comparación de medias se toma una referencia diferente. En la Tabla 30 los tratamientos están ordenados de menor a mayor contenido total de nitrógeno en la biomasa aérea, y las comparaciones con la prueba DMS se realizan frente al valor más bajo de cada variable dependiente, que está señadada en negrilla. Como era previsible, el valor más bajo corresponde a uno de los controles. Las variables concentración de nitrógeno en la biomasa aérea y biomasa aérea también alcanzaron los valores más bajos para alguno de los controles. El aislado OLQ1051 no es efectivo, pues tanto el contenido de nitrógeno como la biomasa aérea, no difieren de los controles.

En la Tabla 31, los tratamientos están ordenados de mayor a menor contenido total de nitrógeno en la biomasa aérea, y la comparación de medias indica la significación de las diferencias – si las hubiera – entre el valor más elevado de cada variable dependiente y los restantes. El aislado que mayor eficiencia presenta es VLP1091, lo que se manifiesta porque alcanza los valores más elevados de biomasa aérea, y porcentaje y contenido total de nitrógeno en dicha biomasa. La cepa ESC1020 no difiere significativamente en ninguna de estas tres variables dependientes de VLP1091. ESC1110 solo difiere a un bajo nivel de significación ($0,01 < p < 0,05$) en el contenido total de nitrógeno. OAC1020 y VPA1020 difieren de la más efectiva a un nivel moderadamente significativo ($0,001 < p < 0,01$) en el contenido

total de nitrógeno, y OAC1020 además difiere a un bajo nivel de significación ($p < 0,05$) en la biomasa aérea. Los restantes aislados tuvieron contenidos totales de nitrógeno significativamente ($p < 0,001$) más bajas que VLP1091. Por tanto los cinco aislados indicados anteriormente son los que mayor efectividad presentan, en estas condiciones.

Tabla 30. Valores medios de las variables dependientes del experimento de habichuela roja José Beta, en medio hidropónico, para los tratamientos de inoculación y su comparación con el valor más reducido (en negrita) de cada variable dependiente (prueba DMS) La tabla está ordenada de menor a mayor valor de contenido total de N en la biomasa aérea.

CEPA	N total en la biomasa aérea (mg planta ⁻¹)		%N en la biomasa aérea		Biomasa aérea (mg planta ⁻¹)		Biomasa de raíces (mg planta ⁻¹)	
	Media	Significación	Media	Significación	Media	Significación	Media	Significación
Control 5	8,5		1,81	-	468,5		396,8	-
Control 1	9,6	-	1,66		581,8	*	403,4	-
Control 4	10,5	-	1,81	-	582,0	*	478,8	**
Control 3	11,1	-	1,71	-	650,5	**	453,8	*
OLQ1051	11,4	-	2,34	-	478,1	-	404,8	-
OLQ1052	14,0	***	3,04	***	474,9	-	474,9	**
VPA1100	15,0	***	2,94	***	509,3	-	426,3	-
VCS3041	17,9	***	2,58	*	715,9	***	487,6	***
VPA1010	18,3	***	3,31	***	553,4	-	454,2	*
ESC1060	18,8	***	3,92	***	477,3	-	352,9	-
OAC1140	19,0	***	3,07	***	615,9	**	380,5	-
VAR1140	19,0	***	3,11	***	609,2	*	386,4	-
OAC1150	23,1	***	3,25	***	711,4	***	399,4	-
ESC1120	25,1	***	3,37	***	744,9	***	470,0	**
VCS3090	25,3	***	3,01	***	841,8	***	442,8	*
VRI2090	29,0	***	3,62	***	800,7	***	393,9	-
VPA1020	30,4	***	3,59	***	846,8	***	455,7	*
OAC1020	31,2	***	3,89	***	802,8	***	421,6	-
ESC1110	32,2	***	3,77	***	852,7	***	407,9	-
ESC1020	33,8	***	3,87	***	873,9	***	473,8	**
VLP1091	36,6	***	3,93	***	932,4	***	348,5	

Significación: *** $p < 0,001$; ** $< 0,001p < 0,01$; * $0,01p < 0,05$

Tabla 31. Valores medios de las variables dependientes del experimento de habichuela roja José Beta, en medio hidropónico, para los tratamientos de inoculación y su comparación con el valor más elevado (en negrita) de cada variable dependiente (prueba DMS) La tabla está ordenada de mayor a menor valor de contenido total de N en la biomasa aérea.

CEPA	N total en la biomasa aérea (mg planta ⁻¹)		%N en la biomasa aérea		Biomasa aérea (mg planta ⁻¹)		Biomasa de raíces (mg planta ⁻¹)	
	Media	Significación	Media	Significación	Media	Significación	Media	Significación
VLP1091	36,6		3,93		932,4		348,5	***
ESC1020	33,8	-	3,87	-	873,9	-	473,8	-
ESC1110	32,2	*	3,77	-	852,7	-	407,9	-
OAC1020	31,2	**	3,89	-	802,8	*	421,6	-
VPA1020	30,4	**	3,59	-	846,8	-	455,7	-
VRI2090	29,0	***	3,62	-	800,7	*	393,9	*
VCS3090	25,3	***	3,01	*	841,8	-	442,8	-
ESC1120	25,1	***	3,37	-	744,9	***	470,0	-
OAC1150	23,1	***	3,25	-	711,4	***	399,4	*
VAR1140	19,0	***	3,11	-	609,2	***	386,4	*
OAC1140	19,0	***	3,07	*	615,9	***	380,5	*
ESC1060	18,8	***	3,92	-	477,3	***	352,9	**
VPA1010	18,3	***	3,31	-	553,4	***	454,2	-
VCS3041	17,9	***	2,58	***	715,9	***	487,6	
VPA1100	15,0	***	2,94	**	509,3	***	426,3	-
OLQ1052	14,0	***	3,04	*	474,9	***	474,9	-
OLQ1051	11,4	***	2,34	***	478,1	***	404,8	*
Control 3	11,1	***	1,71	***	650,5	***	453,8	-
Control 4	10,5	***	1,81	***	582,0	***	478,8	-
Control 1	9,6	***	1,66	***	581,8	***	403,4	*
Control 5	8,5	***	1,81	***	468,5	***	396,8	*

Significación: *** $p < 0,001$; ** $< 0,001p < 0,01$; * $0,01p < 0,05$

Las diferencias de efectividad entre los aislados fueron muy amplias, triplicando el contenido de nitrógeno en los más efectivos frente a los menos, y duplicando la producción de biomasa aérea. Dieciséis de los 17 aislados presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) con respecto al control sin nitrógeno en la variable contenido total de nitrógeno, y diez en la variable biomasa aérea (Tabla 30).

Todos los aislados presentaron valores significativamente ($p < 0,001$) más bajos para todas las variables relacionadas con la biomasa aérea frente al control con nitrógeno (datos no mostrados). La Tabla 32 presenta los valores de efectividad de la fijación en cada uno de los aislados analizados, y el porcentaje del nitrógeno de la biomasa que deriva de la fijación. En cuanto a la efectividad, los valores llegaron al 40 % en el más efectivo y bajaron del 10% en los tres menos efectivos. Se trata de valores bajos, pero superiores a los observados por Giongo *et al.* (2007) en rizobios nativos aislados de suelos de Brasil, en el estado de Rio Grande do Sul. Sin embargo, nuestros resultados son inferiores a los mejores obtenidos por Motasso *et al.* (2002) en la región brasileña de los Cerrados, también con microsimbiontes autóctonos que no habían sido preseleccionados. En dicho trabajo observaron un rango de variación muy amplio, de manera que los menos efectivos de su trabajo y del nuestro presentaron valores similares. Hungría *et al.* (2000), partieron de cepas autóctonas del estado de Paraná en Brasil, pero habían realizado una selección previa por su capacidad de fijación de nitrógeno, y en estas condiciones los porcentajes de eficiencia se encontraron entre el 43% y el 100%. Todos los trabajos a los que se ha hecho mención, utilizaron *Phaseolus vulgaris* como macrosimbionte. De estos resultados, se deduce que para desarrollar un inoculante eficaz, es necesario efectuar un proceso de selección por la efectividad simbiótica. Las grandes diferencias entre aislados nativos es lo habitual, y ha sido comprobado por varios investigadores con *Phaseolus vulgaris* y otros cultivos (Zaman-Allah, *et al.*, 2007, Giongo *et al.*, 2007, Hungría *et al.*, 2000, Motasso *et al.*, 2002). Sin embargo también existen excepciones a esta regla, como sucedió con los trabajos de Gonzalez *et al.* (2008) que partiendo de cepas nativas no seleccionadas procedentes de Brasil y Venezuela, observaron efectividades superiores al 69% en todos los aislados salvo en uno, por lo que el rango de variación fue más bajo de lo habitual y todas las cepas del alta efectividad.

En cuanto al porcentaje de nitrógeno que deriva de la fijación simbiótica, en las cepas más efectivas se observan valores entre el 66 y el 73%, mientras que en las menos efectivas, están por debajo del 45%, llegando hasta el 13%. Estos valores concuerdan con los resultados obtenidos en otros trabajos con el mismo macrosimbionte, independientemente de la identidad taxonómica del microsimbionte.

La biomasa radicular o subterránea, no tuvo aparentemente relación con la biomasa aérea, alcanzando el valor más bajo en las plantas inoculadas con la cepa más efectiva. Este mismo resultado fue obtenido por González Andrés y Ortiz (1999), que lo atribuyeron a que

en condiciones de alta fijación de N₂ atmosférico, la raíz no tiene necesidad de explorar el sustrato para alcanzar el principal nutriente. Sin embargo algunas de las plantas inoculadas con aislados poco efectivos o incluso los propios testigos no difirieron significativamente en la longitud de las raíces.

Tabla 32. Valor medio del nitrógeno en la biomasa aérea para cada aislado y su efectividad de fijación de N₂ respecto al control con N

Tratamiento	N total (mg planta ⁻¹)	Efectividad fijación N (%)	%N derivado de la fijación simbiótica
VLP1091	36,6	39,7	72,9
ESC1020	33,8	35,6	70,6
ESC1110	32,2	33,2	69,2
OAC1020	31,2	31,7	68,2
VPA1020	30,4	30,5	67,3
VRI2090	29,0	28,4	65,8
VCS3090	25,3	22,9	60,8
ESC1120	25,1	22,6	60,4
OAC1150	23,1	19,6	57,0
VAR1140	19,0	13,5	47,7
OAC1140	19,0	13,5	47,7
ESC1060	18,8	13,2	47,2
VPA1010	18,3	12,5	45,7
VCS3041	17,9	11,9	44,5
VPA1100	15,0	7,6	33,8
OLQ1052	14,0	6,1	29,1
OLQ1051	11,4	2,2	12,9

4.7. EFECTIVIDAD EN CONDICIONES DE MICROCOSMOS

Cinco de los ocho aislados que presentaron mayor efectividad en cultivo hidropónico, fueron evaluados en microcosmos, con el objeto de seleccionar posibles candidatos para inoculantes de habichuela en República Dominicana. En todo proceso de selección de aislados como inoculantes, es imprescindible realizar estudios sobre suelo real, especialmente para comprobar si los microorganismos con buena capacidad de fijación en condiciones óptimas para el proceso simbiótico, son capaces de competir con el resto de microorganismos existentes en el suelo, y de adaptarse a las condiciones físicoquímicas del suelo. La competitividad y la eficiencia simbiótica son independientes (Amarger, 1981, Castro *et al.*, 2000) y en la competitividad influyen factores genéticos, dependientes del micro y del macrosimbionte, pero también medioambientales y biológicos (Rodríguez Blanco *et al.*, 2010). No obstante, la estrategia utilizada en este estudio, de buscar cepas efectivas a nivel local, puede ser clave para una mejor adaptación al suelo donde se pretenden introducir (Motasso *et al.*, 2002). Los aislados analizados en microcosmos provenían de las tres provincias incluidas en el estudio, dos de Elías Piña, dos de La Vega y una de San José de Ocoa, y fueron ensayados sobre suelos de estas tres provincias.

La Tabla 33 muestra el resultado del ANOVA combinado del experimento de microcosmos para todas las variables dependientes y las variables independientes suelo y

Tabla 33. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de habichuela roja variedad José Beta en microcosmos, para los tratamientos suelo e inoculación.

	Biomasa aérea (g)			Índice de Cosecha			Vainas por Planta			Semillas por Vaina		
	Media Cuadrática	F	p	Media Cuadrática	F	p	Media Cuadrática	F	p	Media Cuadrática	F	p
Suelo	597,086	112,072	0,000	0,177	17,811	0,000	183,567	105,108	0,000	0,595	1,279	0,280
Inoculación	34,298	6,438	0,000	0,016	1,631	0,139	9,519	5,451	0,000	0,778	1,674	0,127
Suelo*Inoculación	11,694	2,195	0,012	0,005	0,554	0,877	2,220	1,271	0,235	0,871	1,873	0,038

	Peso 100 Semillas (g)			Biomasa de Semillas (g planta ⁻¹)			Porcentaje de N en las semillas			N en Semillas (mg planta ⁻¹)		
	Media Cuadrática	F	p	Media Cuadrática	F	p	Media Cuadrática	F	p	Media Cuadrática	F	p
Suelo	3246,813	10,482	0,000	271,276	71,415	0,000	0,069	0,781	0,459	322206,329	68,436	0,000
Inoculación	353,686	1,142	0,338	10,347	2,724	0,014	2,905	33,090	0,000	27629,707	5,868	0,000
Suelo*Inoculación	390,566	1,261	0,242	4,476	1,178	0,298	1,415	16,111	0,000	10121,802	2,150	0,014

Tabla 34. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de habichuela roja variedad José Beta en microcosmos, para las variables independientes tratamiento de inoculación y suelo. Las comparaciones estadísticas se han realizado para los valores promedio, no difiriendo significativamente los valores seguidos por la misma letra (prueba DMS, p<0,05).

Variable	Suelo	Tratamiento de inoculación					Control sin Nitrógeno	Control con Nitrógeno	Promedios
		ESC1020	ESC1120	VLP1091	OAC1020	VR12090			
Biomasa aérea (g)	Constanza	4,4	3,6	4,0	4,1	4,3	3,6	5,8	4,2 a
	Hondo Valle	5,4	6,9	6,4	7,5	7,6	5,3	10,8	7,2 b
	Rancho Arriba	9,1	9,3	9,0	9,3	9,6	8,3	9,3	9,1 c
	Promedios	6,4 ab	6,5 ab	6,6 ab	7,0 b	7,1 b	5,8 a	8,7 c	
Índice de cosecha	Constanza	0,49	0,49	0,50	0,52	0,52	0,54	0,52	0,51a
	Hondo Valle	0,54	0,52	0,56	0,57	0,50	0,60	0,55	0,55b
	Rancho Arriba	0,60	0,56	0,63	0,60	0,59	0,61	0,58	0,60c
	Promedios	0,54	0,52	0,57	0,56	0,54	0,58	0,55	
Vainas por Planta	Constanza	3,40	2,60	3,42	3,00	3,13	2,50	4,31	3,2a
	Hondo Valle	3,92	4,77	4,23	4,62	4,31	3,33	5,54	4,4b
	Rancho Arriba	5,67	6,00	5,27	5,87	6,33	5,67	6,47	5,9c
	Promedios	4,36ab	4,37ab	4,38ab	4,52b	4,60b	3,90a	5,49c	
Semillas por Vaina	Constanza	2,56	2,59	2,20	2,75	2,65	3,08	2,28	2,60
	Hondo Valle	2,42	2,26	2,69	2,86	2,61	2,56	3,02	2,63
	Rancho Arriba	2,80	2,49	2,96	2,77	2,68	2,94	2,51	2,74
	Promedios	2,61	2,45	2,65	2,79	2,65	2,88	2,60	
Peso 100 Semillas (g)	Constanza	25,9	27,4	28,8	26,9	28,2	27,1	29,0	27,6a
	Hondo Valle	31,2	37,7	33,5	35,6	51,9	39,7	39,5	38,5b
	Rancho Arriba	34,4	50,1	37,2	35,6	34,0	31,5	34,5	36,5b
	Promedios	30,5	37,9	33,5	32,7	37,4	32,4	34,4	
Biomasa de Semillas (g planta ⁻¹)	Constanza	2,2	1,8	2,0	2,2	2,2	2,0	3,2	2,2a
	Hondo Valle	3,0	3,9	3,7	4,6	4,4	3,4	6,3	4,2b
	Rancho Arriba	5,5	5,7	5,6	5,6	5,7	5,1	5,4	5,5c
	Promedios	3,6a	3,7a	3,9a	4,15ab	4,09a	3,5a	5,0b	
%N en las semillas	Constanza	3,50	3,35	3,47	3,32	3,41	3,37	4,52	3,56
	Hondo Valle	4,13	3,51	3,28	3,16	3,29	3,48	4,09	3,56
	Rancho Arriba	3,24	4,00	3,35	3,15	3,66	3,66	3,56	3,52
	Promedios	3,59c	3,61c	3,36b	3,20a	3,46b	3,51c	4,03d	
N en Semillas (mg planta ⁻¹)	Constanza	76,0	60,1	70,8	71,8	75,8	66,4	143,9	79,9a
	Hondo Valle	114,6	132,6	119,2	143,1	143,5	116,4	252,0	146,6b
	Rancho Arriba	177,4	228,3	187,6	177,1	208,8	185,5	193,0	193,3c
	Promedios	123,2a	136,4a	130,3a	131,5a	142,7a	124,6a	196,1b	

tratamiento de inoculación. La Tabla 34 presenta los valores medios de las variables dependientes y la comparación de dichos valores mediante la prueba post hoc de la diferencia mínima significativa (DMS, $p < 0,05$).

En el ANOVA combinado (Tabla 33) se observa que las variables dependientes biomasa aérea, vainas por planta, y porcentaje y contenido total de nitrógeno en las semillas, presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) para las dos variables independientes, suelo y tratamiento de inoculación. El peso de 100 semillas solo presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) para el suelo. El rendimiento por planta, estimado como la biomasa de semillas, difirió a un alto nivel de significación entre suelos ($p < 0,001$) y a un nivel menor de significación ($p \approx 0,01$) entre tratamientos de inoculación.

Las interacciones entre suelo y tratamiento de inoculación solo fueron significativas, para la biomasa aérea total, y para el porcentaje ($p < 0,001$) y contenido total de nitrógeno en las semillas ($p \approx 0,01$), y a un nivel menor para las semillas por vaina.

A continuación se destacan los resultados obtenidos para cada una de las variables dependientes (Tabla 34):

La biomasa aérea fue diferente en los tres suelos, siendo superior en Rancho Arriba e inferior en Constanza. También existieron algunas diferencias significativas entre tratamientos de inoculación, con valores máximos en el control con nitrógeno, que difieren significativamente de los demás tratamientos. Los valores mínimos correspondieron al control sin nitrógeno, la biomasa aérea obtenida con tres de los inóculos no difirió de los valores de este control. Sin embargo, con VRI2090 y OAC1020, la biomasa total fue intermedia entre los dos controles, presentando diferencias significativas respecto a ambos.

La comparación de los tratamientos de inoculación de forma independiente en cada uno de los suelos (Figura 21) permite observar que las diferencias entre tratamientos antes indicadas son muy débiles, y confirma la naturaleza de las interacciones entre suelo y tratamiento, que se deben a que el testigo fertilizado con nitrógeno produce mayor cantidad de biomasa solamente en dos de los tres suelos, mientras que en el tercero no hay diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

El índice de cosecha presentó diferencias significativas entre los tres suelos, con la misma tendencia que la biomasa aérea, indicando que en el suelo de Constanza, además de producirse menor biomasa total, también la proporción de semillas es menor, ocurriendo lo contrario para el suelo de Rancho Arriba. Sin embargo no hubo diferencias entre tratamientos.

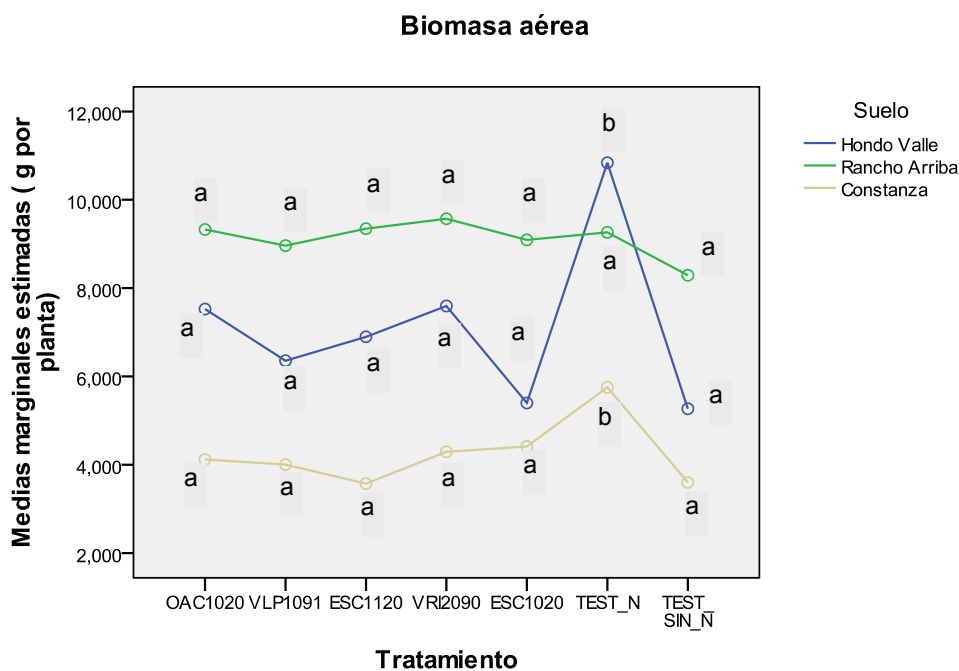


Figura 21. Variación de los valores medios de la biomasa aérea en el ensayo de microcosmos, en función de las variables independientes suelos y tratamientos.

El número de vainas por planta también presentó diferencias entre suelos, del mismo tipo de las observadas para las variables anteriormente analizadas. Los tratamientos de inoculación produjeron el mismo tipo de diferencias y con el mismo nivel de significación que en la biomasa aérea. Es decir, fue máximo en el control con nitrógeno, mínimo en el control sin nitrógeno e intermedio en las plantas inoculadas con OAC1020 y con VRI2090.

El número de semillas por vaina no presentó diferencias entre suelos ni entre tratamientos.

El peso de 100 semillas fue significativamente más bajo en el suelo de Constanza que en los otros dos suelos, entre los que no existieron diferencias significativas.

La biomasa de semillas por planta permite estimar el rendimiento por planta, y de nuevo varía muy significativamente entre suelos, siguiendo el mismo tipo de variación que los demás parámetros analizados, es decir mínimo en Constanza, máximo en Rancho Arriba e intermedio en Hondo Valle.

El rendimiento por planta fue significativamente más elevado en el control fertilizado con nitrógeno, pero no difirió estadísticamente del rendimiento alcanzado por las plantas inoculadas con el aislado OAC1020 y si difirió del alcanzado con el resto de los tratamientos. Existe por tanto una tendencia aunque débil, que indica que la inoculación con OAC1020

permite rendimientos similares al abonado con nitrógeno químico. La debilidad de esta tendencia se debe a que el rendimiento inoculando con OAC1020 tampoco difiere del obtenido con el resto de los tratamientos, incluido el control sin fertilización nitrogenada.

El contenido total de nitrógeno en las semillas, depende de la biomasa de semillas formadas y de la concentración de nitrógeno en dichas semillas. El nitrógeno total difiere significativamente entre suelos y tratamientos de inoculación, aunque el porcentaje de nitrógeno en las semillas solamente varía entre tratamientos de inoculación y no entre suelos. Las diferencias de nitrógeno total entre los diferentes suelos, dependen por tanto únicamente de las diferencias en el rendimiento de las plantas.

En cuanto a la influencia del tratamiento de inoculación en el contenido total de nitrógeno en las semillas, de nuevo vuelve a predominar la influencia del rendimiento de la planta frente a la concentración de nitrógeno. Esta última fue significativamente más elevada en el control fertilizado con nitrógeno (en torno al 4%), mientras que los tratamientos inoculados presentaron valores en torno al 3,5%, con diferencias escasas pero significativas entre ellos. Como resultado, el contenido total de nitrógeno fue significativamente más elevado en el control abonado, y no existieron diferencias entre el control sin nitrógeno y los tratamientos inoculados. Como era previsible este último control, mostró un valor muy bajo, superado ampliamente por los tratamientos inoculados, excepto uno de ellos – ESC1020 –, si bien los valores a los que se hace referencia no difirieron entre sí, indicando por tanto solamente tendencias.

Las interacciones entre suelo y tratamiento fueron significativas tanto en el porcentaje de nitrógeno (Figura 22) como en el nitrógeno total en las semillas (Figura 23). En el primer caso las interacciones son muy complejas, destacando que el suelo de Rancho Arriba la concentración de nitrógeno en las semillas fue superior en las plantas inoculadas con ESC1120, en el de Hondo Valle sin embargo los valores más elevados se obtuvieron inoculando con ESC1020 – que proporcionó los valores más bajos en Rancho Arriba – y en el control con nitrógeno. Por último en el suelo de Constanza destacó claramente el control con nitrógeno. En el caso del contenido total de nitrógeno, no existieron diferencias entre tratamientos para uno de los suelos, el de Rancho Arriba, mientras que para los otros dos, los valores fueron significativamente más elevados en el control con nitrógeno.

Un aspecto a destacar son las grandes diferencias en todas las variables dependientes entre los diferentes suelos, y el hecho de que no existan interacciones de manera generalizada entre el suelo y el tratamiento de inoculación, por lo que no existe una mejor adaptación de determinadas cepas a determinados suelos. De la analítica de suelos realizada (Tabla 17) no puede deducirse un factor químico, que pueda tener repercusiones tan claras en el desarrollo de las plantas. Tampoco es posible atribuirlo a una influencia diferencial de las condiciones ambientales dentro del invernadero, pues el diseño del

experimento fue completamente aleatorio con tres repeticiones. Las razones hay que buscarlas en factores bióticos, que obligaron a resembrar retrasando el desarrollo de las plantas.

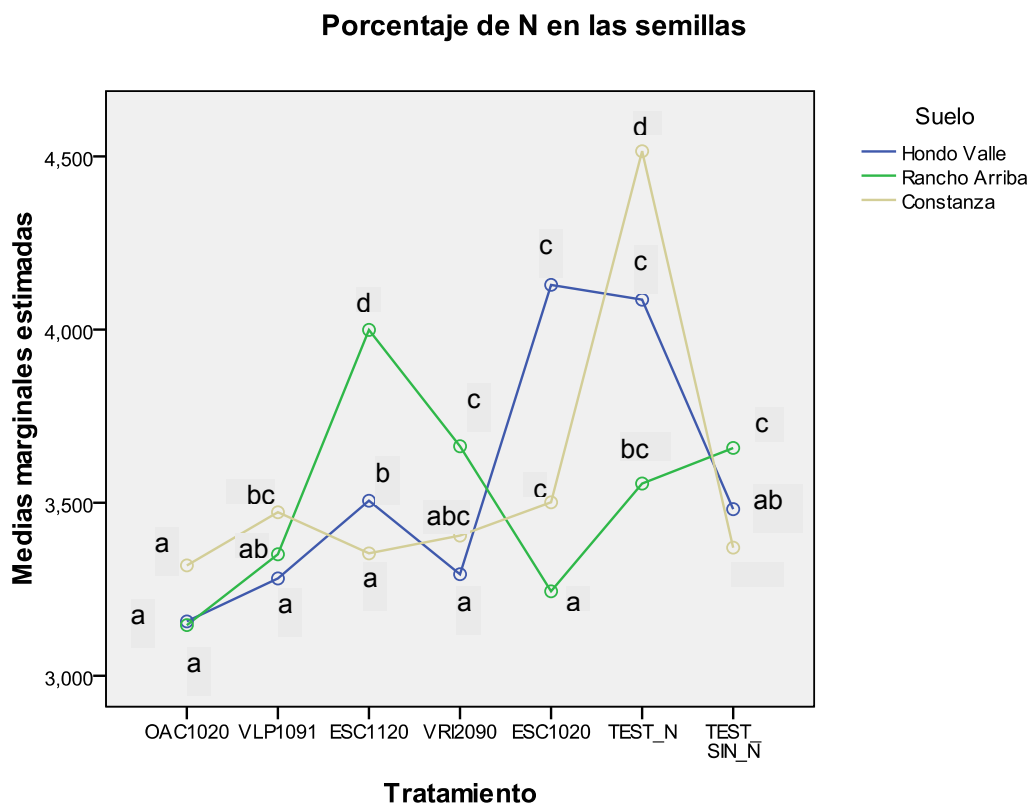


Figura 22. Variación de los valores medios del porcentaje de nitrógeno en las semillas en el ensayo de microcosmos, en función de las variables independientes suelos y tratamientos.

Ha quedado demostrado estadísticamente que en condiciones de microcosmos, la fertilización con nitrógeno supera a la inoculación con las cepas seleccionadas. Este resultado viene a confirmar los obtenidos por otros investigadores, lo que ha traído como consecuencia, que la simbiosis Rhizobium – Phaseolus vulgaris sea considerada tradicionalmente como poco eficiente (Isoi y Yosida, 1991 en Rodríguez-Navarro *et al.* 2000) lo que ha creado una corriente de opinión que pone en entredicho los beneficios de la inoculación para este cultivo. No obstante hay que tener en cuenta que las condiciones de microcosmos, especialmente en zonas tropicales, no son las más adecuadas para el establecimiento de la simbiosis y la fijación de nitrógeno, pues se alcanzan temperaturas muy elevadas en la masa de suelo confinado de la maceta, donde se desarrollan las raíces, pues ha quedado demostrado que las temperaturas elevadas de las zonas tropicales, incluso en campo, reducen drásticamente la nodulación y la fijación (Hungria y Franco, 1993, Hungria y Vargas, 2000). Las macetas fueron cultivadas en invernadero para prevenir la entrada de plagas, proteger de la excesiva

insolación y de las fuertes lluvias características de las regiones tropicales. El cultivo en invernadero está bastante extendido en República Dominicana, y los principales objetivos de este tipo de instalaciones son las indicadas anteriormente. Para evitar que las temperaturas suban excesivamente, los invernaderos son abiertos por las paredes laterales, protegidos por una malla anti-insectos, y suelen tener una malla de sombreado en el techo. A pesar de esto, la maceta alcanza temperaturas superiores que las del suelo, que pudieron ser excesivas para un correcto desarrollo de la simbiosis. Estas condiciones pueden explicar también el escaso rendimiento de semillas, pues en ningún caso las plantas estuvieron sometidas a déficit hídrico. Los rendimientos que oscilaron entre 2,2 y 5,5 gramos por planta, que en una densidad final de 120.000 plantas por hectárea hubieran supuesto un rendimiento entre 264 y 660 kg por hectárea. Aunque no se puedan extrapolar los rendimientos de microcosmos a campo por no ser las condiciones equiparables, sirve para dar una idea de las escasas producciones obtenidas.

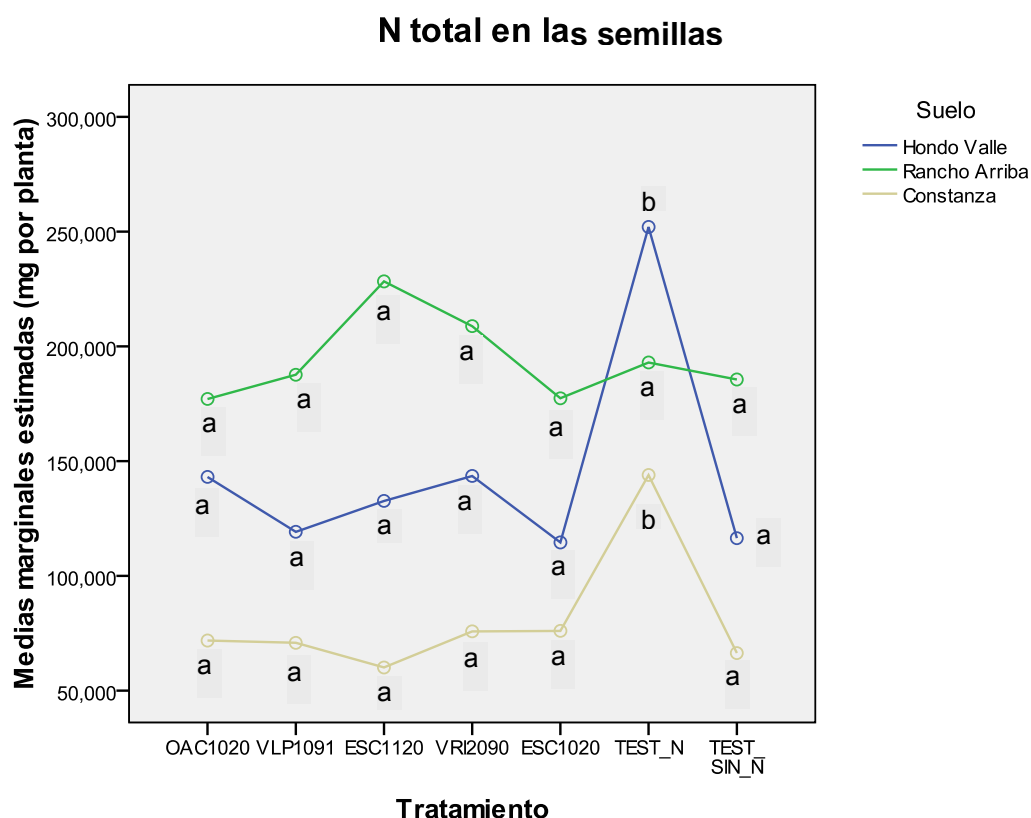


Figura 23. Variación de los valores medios del contenido total de nitrógeno en las semillas en el ensayo de microcosmos, en función de las variables independientes suelos y tratamientos.

Aún en estas circunstancias desfavorables, existen indicios de que las cepas OAC1020 y VRI2090 producen mejor desarrollo de las plantas, que el testigo sin nitrógeno. La biomasa aérea total es significativamente más elevada que en el control sin fertilizar, un 22%, y también el número de vainas por planta, un 18%. Sin embargo, aunque el rendimiento en semillas es también un 17-19% superior en las plantas inoculadas con OAC1020 y VRI2090, frente al control sin nitrógeno, no existen diferencias significativas, y tampoco en el contenido total de N en las semillas. Los aislados que mejores resultados proporcionaron en microcosmos, no fueron los de mayor efectividad en cultivo hidropónico en condiciones de esterilidad. Esto es bastante habitual, ya que en microcosmos entran en juego no solo la efectividad de la cepa sino su capacidad de adaptación al medio y la competencia con otros microorganismos edáficos.

Aunque en habichuela no se obtuviera con la inoculación un rendimiento tan elevado como con la fertilización química, desde un punto de vista productivo es preferible la primera opción, ya que el margen de beneficio para el productor es mayor. Esto es debido al elevado precio de los fertilizantes nitrogenados por el gran consumo energético del proceso de síntesis, además de la posible contaminación de las aguas con nitratos y sus derivados, con consecuencias negativas en el medio ambiente y la salud (de Felipe, 2006).

En condiciones de campo en el Valle del Guadalquivir (España), Daza *et al.* (2000), observaron que el rendimiento de alubia, inoculando con cepas seleccionadas alcanzaba el 66% del obtenido en el control fertilizado con nitrógeno, pero era un 50% más elevado que el obtenido con el control sin nitrógeno. En este caso la especie del microsimbionte era *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. En suelos americanos, en Brasil, varios trabajos de campo que analizan el efecto sobre el rendimiento de la inoculación de *Phaseolus vulgaris* con cepas autóctonas seleccionadas por su efectividad simbiótica (Hungria *et al.*, 2000, Mostasso *et al.*, 2002, Hungria *et al.*, 2003), observaron rendimientos muy similares a los obtenidos en los testigos fertilizados con nitrógeno químico

A pesar de las matizaciones realizadas, el estudio de microcosmos ha permitido seleccionar dos cepas “de élite” frente al resto de aislados. Estas cepas proceden de dos provincias diferentes, San José de Ocoa (OAC1020) y La Vega (VRI2090). Por consiguiente dichas cepas serán probadas en ensayos de campo, como última fase del desarrollo de un biofertilizante para habichuela en República Dominicana. En dichos ensayos de campo, es probable que los rendimientos se aproximen más a los obtenidos con el abonado mineral, que en el microcosmos, tal como ha sucedido en trabajos paralelos realizados dentro del mismo grupo de investigación con alubia de la IGP La Bañeza-León (España) (Mulas, 2010). Atribuimos estos resultados a que las condiciones de campo suelen ser más favorables para el desarrollo y funcionalidad de la simbiosis que las de microcosmos.

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. *Phaseolus vulgaris* establece simbiosis con rhizobia de crecimiento rápido en los suelos de República Dominicana que mostraron su diversidad genética tras el análisis de TP-RAPD presentando ocho perfiles diferentes.
2. La secuenciación completa del gen ribosómico 16S de una cepa representativa de cada perfil de TP-RAPD permitió clasificar las cepas aisladas en el género *Rhizobium*.
3. Las secuencias de los genes *recA* y *atpD* permitieron clasificar a los representantes de dos grupos de TP-RAPD, I y VIII, en la especie *Rhizobium phaseoli*, sin embargo el resto de las cepas posiblemente no pertenecen a ninguna de las especies descritas hasta el momento en este género.
4. Los resultados de la caracterización fenotípica mostraron que las cepas aisladas en este estudio son próximas a las dos especies americanas que son microsimbiontes típicos de *Phaseolus*, *Rhizobium etli* y *Rhizobium phaseoli*.
5. Todas las cepas de rhizobia aisladas fueron capaces de nodular *P. vulgaris* y de acuerdo con sus secuencias del gen *nodC* pertenecen a la biovariedad phaseoli. Las cepas aisladas presentaron los mismos alelos de este gen que cepas americanas de *R. etli* y cepas españolas de esta especie y de otras especies próximas a *R. leguminosarum*.
6. La efectividad simbiótica de los aislados fue muy variable, alcanzando el 40 % en el más efectivo y bajando del 10% en los tres menos efectivos, tratándose de valores bajos pero acordes con los obtenidos por otros autores. El porcentaje de nitrógeno que deriva de la fijación simbiótica varió entre el 73% y el 13%.
7. En el proceso de selección en microcosmos, dos de las cinco cepas analizadas (OAC1020 y VRI2090) produjeron un desarrollo significativamente mayor que el testigo sin fertilizar con nitrógeno, con un 22% más de biomasa aérea y un 19% más de rendimiento de grano, si bien el último valor no es significativo desde el punto de vista estadístico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aarons, S. R. y Graham, P. H. (1991). Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli to acidity. *Plant Soil* **134**, 145-151.
- Aguilar, O. M., Riva, O. y Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13548-13553.
- Álvarez Martínez, E. R. (2007). Coevolución de Plantas Leguminosas Herbáceas de la Provincia Corológica Mediterránea Ibérica Occidental y de sus Endosimbiontes Bacterianos. En *Microbiología y Genética*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Alvarez-Martínez, E. R., Valverde, A., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P. F., Santillana, N., Zúñiga, D., Peix, A. y Velázquez, E. (2009). The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Arch Microbiol* **191**, 659-668.
- Allen, O. N. y Allen, E. K. (1981). *The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation*. Madison, Wisconsin, U.S.A.: University of Wisconsin Press.
- Amarger, N. (1981). Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. *Soil Biol Biochem* **13**, 481-486.
- Amarger, N., Macheret, V. y Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* **47**, 996-1006.
- Amarger, N. (2001). *Rhizobia* in the field. En *Advances in Agronomy*. London (UK): Academic Press.
- An, D. S., Im, W. T., Yang, H. C. y Lee, S. T. (2006). *Shinella granulii* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeooides* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 443-448.
- Andrade, D. S., Murphy, P. J. y Giller, K. E. (2002). The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil *Appl Environ Microbiol* **68**, 4025-4034.
- Anyango, B., Wilson, K. J., Beynon, J. L. y Giller, K. E. (1995). Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils of contrasting pHs. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4016-4021.
- Bailly, X., Olivieri, I., Brunel, B., Cleyet-Marel, J. C. y Bena, G. (2007). Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol* **189**, 5223-5236.
- Ballard, R. A., Charman, N., McInnes, A. y Davidson, J. A. (2004). Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. viciae) populations in South Australian soils. Nitrogen Fixation in Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference. *Soil Biol Biochem* **36**, 1347-1355.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. y Gresshoff, P. M. (1992). DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 70-76.
- Bauer, W. D. y Mathesius, U. (2004). Plant response to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 429-433.
- Beck, D. P., Materon, L. A., Afandi, F. (1993). Practical Rhizobium-Legume technology manual. Technical Manual No. 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria.
- Benson, D. R. y Silvester, W. B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* **57**, 293-319.
- Berg, R. H., Tyler, M. E., Novick, N. J., Vasil, V. y Vasil, I. K. (1980). Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. *Appl Environ Microbiol* **39**, 642-649.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-198.
- Bernal, G. y Graham, P. H. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can J Microbiol* **47**, 526-534.

- Beyene, D., Kassa, S., Ampy, F., Asseffa, A., Gebremedhin, T. y van Berkum P. (2004).** Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Arch Microb* **181**, 129-136.
- Beynon, J. L. y Josey, D. P. (1980).** Demonstration of heterogeneity in natural populations of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J Gen Microbiol* **118**, 437-442.
- Bhardwaj, K. K. R. (1975).** Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkaline soils. *Plant Soil* **134**, 145-151.
- Bhuvaneswari, T. V., Bhagwat, A. A. y Bauer, W. D. (1981).** Transient susceptibility of root Cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol* **68**, 1144-1149.
- Booger, F. C. y van Rossum, D. (1997).** Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Reviews* **21**, 5-27.
- Bouzar, H. y Jones, J. B. (2001).** *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1023-1026.
- Boyd, M., Varney, T., Surette, C., Surette, J. (2008).** Reassessing the northern limit of maize consumption in North America: stable isotope, plant microfossil, and trace element content of carbonized food residue. *J Archaeol Sci* **35**, 2545-56.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R. y Romero, D. (2000).** In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**, 34-43.
- Broughton, W. J. y Perret, X. (1999).** Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 305-311.
- Brücher, H. (1988).** The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. En *Genetic resources of bean species and varieties to common blight and bacterial wilt/beans*, pp. 185-214. Edited by P. Gepts. Dordrecht, the Netherlands.: Kluwer.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. y Gresshoff, P. M. (1991).** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnol* **9**, 553-557.
- Casida, L. E. J. (1982).** *Ensifer adhaerens* gen nov. sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* **32**, 339-345.
- Castro, S., Carrera, I., Martínez-Drets, G. (2000).** Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *J Microbiol Meth* **41**, 173-177.
- Cole, M. A. y Elkan, G. H. (1979).** Multiple antibiotic resistant 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.
- Cronquist, A. (1988).** *The Evolution and Classification of FLOWERING PLANTS*. Bronx, New York. U.S.A.: New York Botanical Garden.
- Chen, W. X., Yan, G. H. y Li, J. L. (1988).** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 392-397.
- Chen, W., Li, G., Qi, Y., Wang, E., Yuan, H. y Li, J. (1991).** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus* *Int J Syst Evol Microbiol* **41**, 275-280.
- Chen, W. X., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. y Li, Y. (1995).** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from arid saline environment in Xinjiang, people's republic of China. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 153-159.
- Chen, W. X., Tan, Z. Y., Gao, J. L., Li, Y. y Wang, E. T. (1997).** *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 870-873.

- Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M. y Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1729-1735.
- Chen, W. M., James, E. K., Coenye, T., Chou, J. H., Barrios, E., de Faria, S. M., Elliott, G. N., Sheu, S. Y., Sprent, J. I. y Vandamme, P. (2006). *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1847 - 1851.
- Chen, W. M., Zhu, W. F., Bontemps, C., Young, J. P. W. y Wei, G. H. (2010). *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 958-962.
- Daza, A., Santamaría, C., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., Orive, R., Temprano, F. (2000). Perlite as carrier for bacterial inoculants. *Soil Biol Biochem* **32**, 567-572.
- De Felipe, M. R. (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 9-16. Edited by E. Bedmar, J. Gonzálo, C. Lluch y B. Rodelas. Granada: Sociedad Española de Microbiología (SEFIN).
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. y Gillis, M. (1994). Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 715-733.
- De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B. y Gillis, M. (1998a). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* **48** 1277-1290.
- De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. D., Lindstrom, K., Dreyfus, B. y Gillis, M. (1998b). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 369-382.
- Diouf, A., de Lajudie, P., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martinez-Romero, E. y Gueye, M. (2000). Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 159-170.
- Dobert, R. C., Breil, B. T. y Triplett, E. W. (1994). DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 564-572.
- Doetsch, R. N. (1981). Determinative methods of light microscopy. En *Manual of methods for general bacteriology*. Washington, U.S.A.: Am Soc Microb.
- Doignon-Bourcier, F., Willems, A., Coopman, R., Laguerre, G., Gillis, M. y de Lajudie, P. (2000). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3987-3997.
- Dooley, J. J., Harrison, S. P., Mytton, L. R., Dye, M., Cresswell, A., Skot, L. y Beeching, J. R. (1993). Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can J Microbiol* **39**, 665-673.
- Drevon, J. J., Abdelly, C., Amarger, N., Aouani, E. A., Aurag, J., Gherbi, H., Jebara, M., Lluch, C., Payre, H., Schump, O., Soussi, M., Sifi, B. y Trabelsi, M. (2001). An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *J Biotechnol* **91**, 257-268.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L. y Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rastrata*. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 89-98.
- Eaglesham, A. R. J. (1987). The use of intrinsic antibiotic resistance for *Rhizobium* study. En *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*, pp. 185-204. Edited by G. H. Elkan. New York (USA): Dekker.
- Eardly, B. D., Young, J. P. y Selander, R. K. (1992). Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1809-1815.

- Eardly, B. D., Nour, S. M., van Berkum, P. y Selander, R. K. (2005).** Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1328–1335.
- Ejigui, J., Savoie, L., Marin, J., Desrosiers, T. (2007).** Improvement of the nutritional quality of a traditional complementary porridge made of fermented yellow maize (*Zea mays*): effect of maize-legume combinations and traditional processing methods. *Food Nutr Bull* **28**, 23-34.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. y Spratt, B. G. (2004).** eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *FEMS Microb Rev* **186**, 1518-1530.
- Finucane, B., Agurto, P. M., Isbell, W. H. (2006).** Human and animal diet at Conchopata, Peru: stable isotope evidence for maize agriculture and animal management practices during the Middle Horizon. *J Archaeol Sci* 2006; **33**, 1766-1776.
- Foster, C. M., Horner, H. T. y 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.
- Frank, B. (1889).** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **7**, 332-346.
- Friedman, M., Brandon, D. L. (2001).** Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem* **49**, 1069-1086.
- Fulchieri, M. M., Estrella, M. J. y Iglesias, A. A. (2001).** Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Anton Van Leeuw* **79**, 119-125.
- Gao, J. L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H., Gu, J., Terefework, Z., Young, J. P., Lindstrom, K. y Chen, W. X. (2004).** *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2003-2012.
- García-Fraile. (2008).** Identificación y caracterización de cepas que nodulan *Phaseolus* en diferentes regiones de España. Tesis Doctoral. Salamanca.
- García-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martínez-Molina, E., Mateos, P. F. y Velázquez, E. (2007).** *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 844-848.
- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F. y Velázquez, E. (2010).** *Phaseolus vulgaris* is nodulated in Northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeography and evolutionary implications. *Can J Microbiol*. En prensa
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. y Young, J. P. W. (2001).** Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 2037-2048.
- Gepts, P. y Bliss, F. A. (1986).** Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ Bot* **40**, 469-478.
- Gepts, P. y Debouck, D. G. (1991).** Origin, domestication and evolution of the coccon bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En *Common beans: Research for crop improvement*, pp. 7-53. Edited by A. van Schoohoven, Voyses, O. C.A.B. Int. y C.I.A.T: Wallingford, U. K. y Cali, Colombia.
- Geurts, R., Fedorova, E. y Bisseling, T. (2005).** Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 346-352.
- Ghosh, W. y Roy, P. (2006).** *Mesorhizobium thioganicum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 91-97.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. (2008).** Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Ann Rev Gen* **42**, 413-441.
- Giongo, A., Passaglia, L.M.P., Freire, J.R.J. y de Sá, E.L.S. (2007).** Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Biol Fertil Soils* **43**, 593-598.
- Gomes-Barcellos, F., Menna, P., da Silva Batista, J. S. y Hungria, M. (2007).** Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2635-2643.

- Gómez, A. (1983).** Los granos de leguminosas como componentes proteicos para la alimentación animal. En *Leguminosas de Grano*, pp. 249-262. Edited by J. I. Cubero, Moreno, M.T. Madrid: Mundiprensa.
- González, T. O., Capanharo, J. C., Lemos, E. G. M. (2008).** Genetic characterization and nitrogen fixation capacity of *Rhizobium* strains on common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **43**, 1177-1184.
- González - Andrés, F., Ortiz, J.M. (1999).** Specificity of rhizobia nodulating *Genista monspessulana* and *Genista linifolia*, *in vitro* and in field situation. *Arid Soil Res Rehabil* **13**, 223-237.
- Gottfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R. y Hennecke, H. (2001).** Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bacteriol* **183**, 1405-1412.
- Govindarajan, M., Balandreau, J., Kwon, S. W., Weon, H. Y. y Lakshminarasimhan, C. (2007).** Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microb Ecol* **55**, 21-37.
- Graham, P. H. (1963).** Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria of legumes. *Aust J Biol Sci* **16**, 557-559.
- Graham, P. H. y Parker, C. A. (1964).** Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil* **20**, 383-386.
- Graham, P. H., Vitteri, S. E., Mackie, F., Vargas, A. T. y Palacios, A. (1982).** Variations in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crop Res* **5**, 121-128.
- Graham, P. H., Sadowksy, M. J., Keyser, H. H., Barnett, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., De Ley, D. J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B., Strijdom, B. W. y Young, J. P. W. (1991).** Proposed minimal standards for the description of a new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 582-587.
- Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martínez, E., Aarons, S. R. y Quinto, C. (1994).** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can J Microbiol* **40**, 198-207.
- Gu, C. T., Wang, E. T., Tian, C. F., Han, T. X., Chen, W. F., Sui, X. H. y X., C. W. (2008).** *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1364-1368
- Han, T. X., Han, L. L., Wu, L. J., Chen, W. F., Sui, X. H., Gu, J. G., Wang, E. T. y Chen, W. X. (2008).** *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2610-2618.
- Han, T. X., Wang, E. T., Wu, L. J., Chen, W. F., Gu, J. G., Gu, C. T., Tian, C. F. y Chen, W. X. (2008).** *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1693-1699.
- Hana, S. Z., Wanga, E. T. y Chen, W. X. (2005).** Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campyilotropis* and *Cassia* grown in China. *Syst Appl Microb* **28**, 265-276.
- Haukka, K., Lindstrom, K. y Young, J. P. (1998).** Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol* **64**, 419-426.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amager, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1999).** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *Fems Microbiol Ecol* **30**, 87-97.
- Hou, B. C., Wang, E. T., Li, Y. Jr, Jia, R. Z., Chen, W. F., Gao, Y., Dong, R. J. y Chen, W. X. (2009).** *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Nirj.) Vassilcz. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 3051-3057.
- Hungría, M., Andrade, D. S., Chueire, L. M.O., Probanza, A., Gutiérrez-Mañero, F. J., Megías, M. (2000).** Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* **32**, 1515-1528.

- Hungria, M., Franco, A.A. (1993). Effects of high temperatura on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* **149**, 95-102.
- Hungria, M., Vargas, M.A.T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res* **65**, 151-164.
- Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.C. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol Fertil Soils*. **39**, 88-93.
- Iglesias, O., Rivas, R., García-Fraile, P., Abril, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007). Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol Lett* **277**, 210-216.
- Isoi, T., Yoshida, S. (1991). Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Soil Sci Plant Nutr* **37**, 559-563.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernández, M. P., Cleyet-Marel, J. C. y Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 895-898.
- Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* **32**, 136-139.
- Josey, D. P., Beynon, J. L., Lohnston, A. W. B. y Beringer, J. E. (1979). Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J Appl Bacteriol* **46**, 343-350.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. (2008). The genus name *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name '*Sinorhizobium adhaerens*' is not validly published. Opinion 84. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 1973.
- Kao, C. M., Chen, S. C., Chen, Y. S., Lin, H. M. y Chen, Y. L. (2003). Detection of *Burkholderia pseudomallei* in rice fields with PCR-based technique. *Folia Microbiol (Praha)* **48**, 521-524.
- Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D. S. y Campo, R. J. (2006). Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* **32**, 210-220.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Koenig, R. y Gepts, P. (1989). Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*, further evidence for two major centre of genetic diversity. *Theor Appl Genet* **78**, 809-817.
- Kuykendall, L. D. (2005). Order VI. Rhizobiales ord. nov. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), p. 324. New York: Springer.
- Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E. y Udell, S. E. (1993). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol*, 501-505.
- Kwon, S. W., Park, J. Y., Kim, J. S., Kang, J. W., Cho, Y. H., Lim, C. K., Parker, M. A. y Lee, G. B. (2005). Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 263-270.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA, (2000). Los casos del arroz, pollo de granja, leguminosas, leche de vaca y fertilizantes; Santo Domingo, Republica Dominicana, 31 P
- Islam, M. S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Seki, T. (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1416-1429.
- Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F. y Amarger, N. (1994). Rapid identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **60**, 56-63.

- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier, P., Mazurier, S. I., Rigottier-Gois, L. y Amarger, N. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2029-2036.
- Laguerre, G., Noura, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouinb, P. y Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**, 981-993.
- Lareo, L. R. (1988). Acceptability parameters and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). En *Acceptability and nutritional quality of common beans (Phaseolus vulgaris L)*, pp. 1-12. Edited by L. R. Lareo, González, F. Cali, Colombia: C.I.A.T.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. y Denarie, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. & Lock, M. 2005. Legumes of the World. *Royal. Botanic. Gardens. Kew, UK*.
- Lin, D. X., Chen, W. F., Wang, F. Q., Hu, D., Wang, E. T., Sui, X. H. y Chen, W. X. (2009). *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1919-1923.
- Lindström, K. (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 365-367.
- Lindström, K. y Young, J.P.W. (2009). International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: Minutes of the meetings, 31 August 2008, Gent, Belgium. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 921-922.
- Lodwig, E. y Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit Rev Plant Sci* **22**, 37-38.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. y Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**, 554-568.
- Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **47**, 43 - 60.
- Lu, Y. L., Chen, W. F., Han, L. L., Wang, E. T. y Chen, W. X. (2009). *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 3006-3011.
- Lu, Y. L., Chen, W. F., Wang, E. T., Han, L. L., Zhang, X. X., Chen, W. X. y Han, S. Z. (2009). *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 3012-3018.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M. y Willems, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 489-503.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P. y Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 417-426.
- Mateos, P. F., Baker, D. L., Petersen, M., Velázquez, E., Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Molina, E., Squartini, A., Orgambige, G., Hubbell, D. H. y Dazzo, F. B. (2001). Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can J Microbiol* **47**, 475-487.
- Mergaert, J. y Swings, J. (2005). Family IV. Phyllobacteriaceae fam. nov. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), pp. 393. New York, USA: Springer.
- Mendez, F. A. y Alexander, M. (1976). Acclimatation of rhizobia to salts, increasing temperature and acidity. *Rev Latinoamer Microbiol* **18**, 155-158.
- Merabet, C., Martens, M. Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A. y de Lajudie, P. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 664-674.

- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M. y Amarger, N. (2002).** Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol Ecol* **41**, 77-84.
- Michiels, J., Verreth, C. y Vanderleyden, J. (1994).** Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1206-1212.
- Minamisawa, K., Isawa, T., Nakatsuka, Y. y Ichikawa, N. (1998).** New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS alpha. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1845-1851.
- Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E. y Mhamdi, R. (2007).** Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N(2)-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterraneuse) of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* **187**, 79-85.
- Moawad, H., Abd El-Rahim, W. M. y Abd El-Haleem, D. (2004).** Performance of *Phaseolus* bean rhizobia in soils from the major production sites in the Nile Delta. *Comptes Rendus Biologies* **327**, 445-453.
- Morón, B., Dardanelli, M. S., Sousa, C. y Megías, M. (2006).** Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. En *Fijación de Nitrógeno, fundamentos y aplicaciones*, pp. 160-171. Edited by E. Bedmar, Gonzálo, J., Lluch, C., Rodelas, B. Granada: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).
- Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O. y Defez, R. (2005).** Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Syst Appl Microbiol* **28**, 619-631.
- Mostasso, L., Mostasso, F. L., Dias, B. G., Vargas, M. A. T. y Hungría, M. (2002).** Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Res* **73**, 121-132.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C. (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**, 948-950.
- Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Muñoz-Rojas, J. y Caballero-Mellado, J. (2003).** Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb Ecol* **46**, 454-464.
- Nandasena, K. G., O'Hara, G. W., Tiwari, R. P., Willems, A. y Howieson, J. G. (2009).** *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2140-2147
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. y Lindstrom, K. (1999).** *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J Syst Bacteriol* **49** 1359-1368.
- Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, P. y Cleyet-Marel, J. C. (1994).** *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int J Syst Bacteriol* **44**, 511-522.
- Núñez, D. (1999).** Proyecto sobre políticas de comercio y mercadeo de alimentos en la Republica Dominicana. Estudio sobre el Mercado de Leguminosas en Republica Dominicana, Santo Domingo. 64 P.
- Ochman, H. y Morán, N. A. (2001).** Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**, 1096-1099.
- Olivares, J. (2004).** Fijación Biológica de Nitrógeno. Granada (España): Estación Esperimental del Zaidín.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. y Stahl, D. A. (1986).** Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* **40**, 337-365.
- Ophel, K. y Kerr, A. (1990).** *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 236-241.

- Ormeño-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zúñiga-Dávila, D. y Martínez-Romero, E. (2006). Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Syst Appl Microb* **29**, 253-262.
- Pellett, P. L. y Ghosh, S. (2004). Lysine fortification: past, present, and future. *Food Nutr Bull* **25**, 107-113.
- Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W. y Tan, Z. (2008). *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2158-2163.
- Paerl, H. W. (1998). Microbially mediated nitrogen cycling. En *Techniques in Microbial Ecology*, pp. 3-30. Edited by R. S. Burlage, Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G. New York (USA): Oxford University Press.
- Paul, K. H., Dickin, K.L, Ali, N. S., Monterrosa, E. C., Stoltzfus, R. J. (2008). Soy and rice-based processed complementary food increases nutrient intakes in infants and is equally acceptable with or without added milk powder. *J Nutr* **138**, 1963-1968.
- Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180-201.
- Peters, G. A. (1977). The *Azolla-Anabaena azollae* symbiosis. *Basic Life Sci* **9**, 231-258.
- Quan, Z. X., Bae, H. S., Baek, J. H., Chen, W. F., Im, W. T. y Lee, S. T. (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2543-2549.
- Radwan, S. S., Dashti, N., El-Nemr, I. y Khanfer, M. (2007). Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria. *Int J Phytoremediation* **9**, 475-486.
- Ramírez-Bahena, H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889, *R. phaseoli* 1926AL and *R. trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *Rhizobium leguminosarum* DSM 30132^T (=NCIMB 11478^T) as the novel species *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2484-2490.
- Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Willems, A. y Velázquez, E. (2009a). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1929-1934.
- Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Peix, A., Martínez-Molina, E. y Mateos, P. F. (2009b). Phenotypic, genotypic, and symbiotic diversities in strains nodulating clover in different soils in Spain. *Can J Microbiol* **55**, 1207-1216.
- Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T. (1998). Interactions of Gramineous Plants with *Azoarcus* spp. and Other Diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study their Function. *Crit Rev Plant Sci* **17**, 29-54.
- Ribeiro, R. A., Barcellos, F. G., Thompson, F. L. y Hungria M. (2009). Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res Microbiol* **160**, 297-306.
- Rigaud, J. y Puppo, A. (1975). Indol-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**, 223-228.
- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* **22**, 1086-1089.
- Rivas, R., Velázquez, E., Palomo, J. L., Mateos, P. F., García-Benavides, P. y Martínez-Molina, E. (2002a). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Europ J Plant Patol* **108**, 179-184.
- Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B. y Martínez-Molina, E. (2002b). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5217-5222.
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., Kroppenstedt, R. M., Martínez-Molina, E., Gillis, M. y Velázquez E. (2003). Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol* **26**, 47-53

- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., García-Benavides, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Gillis, M. y Velázquez, E. (2004). *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1271-1275.
- Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P. F., Oliveira, S., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007). Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett Appl Microbiol* **44**, 412-418.
- Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol* **32**, 101-110.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñero, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Minguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E. y Mateos, P. F. (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *PNAS*. **105**, 7064-7069.
- Rodríguez Blanco, A., Sicardi, M. y Frioni, L. (2010). Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Biol Fertil Soils*. 10.1007/s00374-010-0439-y
- Rodríguez-Navarro, D.N., Santamaría, C., Temprano, F., Leidi, E.O. (1999). Interaction effects between *Rhizobium* strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition. *Eur J Agron* **11**, 131-143.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Buendía, A. M., Camacho, M., Lucas, M., y Santamaría, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from southwest of Spain. *Soil Biol Biochem* **32**, 1601-1613.
- Rome, S., Fernández, M. P., Brunel, B., Normand, P. y Cleyet-Marel, J. C. (1996). *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* **46**, 972 - 980.
- Roselló-Mora, R. y Amann, R. (2000). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39-67.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). A neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol Biol Evol* **44**, 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 com maíz. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
- Santillana, N., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Velázquez, E. y Zúñiga, D. (2008). Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch Microbiol* **189**, 239-247.
- Sathe, S. K. (2002). Dry bean protein functionality. *Crit Rev Biotechnol* **22**, 175-223.
- Scholla, M. H. y Elkan, G. H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int J Syst Bacteriol* **34**, 484-486.
- Segovia, L., Young, J. P. y Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 374-377.
- Sessitch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H. y Martínez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Crit Rev Plant Sci* **21**, 323-378.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E. y Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 884-893.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Souza, V. y Martínez-Romero, E.. (2005). Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol Ecol* **14**, 4033-50.
- Singh, S. P. (1991). Bean genetics. En *Common beans: Research for crop improvement*, pp. 199-286. Edited by A. van Schoohoven, Voysesst, O. Wallingford, U.K. y Cali, Colombia: C.A.B. Int. y C.I.A.T.

- Singh, U. y Singh, B. (1992).** Tropical grain legumes as important human food. *Econ Bot* **46**, 310-312.
- Sneath, P. H. A. y Socal, R. R. (1973).** *Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco, U.S.A: W.H. Freeman.
- Sneath, P. H. A. (2001).** Numerical Taxonomy. En *Bergey's Manual*, pp. 39-42. Edited by G. Garrity. USA: Springer-Verlag.
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N. y Wuertz, S. (2005).** Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 700-710.
- Spaank, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. (1998).** *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria*: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sprent, J. I., Minchin, F. R. y Parsons, R. (1993).** Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organism wise to inhabit land plants? En *New Horizons in Nitrogen Fixation*, pp. 65-76. Edited by R. Palacios, Mora, J., Newton, W. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academy Publishers.
- Squartini, A., Struffi, P., Doring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velázquez, E., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S. y Nuti, M. P. (2002).** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1267-1276.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. y Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Stepkowski, T., Czaplińska, M., Miedzinska, K. y Moulin, L. (2003).** The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol* **26**, 483-494.
- Sullivan, J. T., Heather, N. P., Lowther, W. L., Scott, D. B. y Ronson, C. W. (1995).** Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8985-8989.
- Sullivan, J. T. y Ronson, C. W. (1998).** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5145-5149.
- Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R. J., De Bruijn, F. J. y Ronson, C. W. (2002).** Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* **184**, 3086-3095.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., García, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. y Dreyfus, B. (2001).** Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* **183**, 214-220.
- Tan, Z. Y., Kan, F. L., Peng, G. X., Wang, E. T., Reinhold-Hurek, B. y Chen, W. X. (2001).** *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 909-914.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., y Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Terefework, Z., Nick, G., Suomalainen, S., Paulin, L. y Lindström, K. (1998).** Phylogeny of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *J Biotechnol* **91**, 169-180.
- Urbano Terrón, P. (2002).** Fitotecnia. Ingeniería de la producción vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997).** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**, 4876-4882.
- Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T., Gu, J. G. y Chen, W. X. (2008).** *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2871-2875.

- Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied & Environmental Microbiology* **71**, 1318-1327.
- Turner, S. L. y Young, J. P. (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **17**, 309-319.
- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M. y Minamisawa, K. (2004). Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J Bacteriol* **186**, 2439-2448.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N. y Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol* **177**, 1414-1417.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Cien Inv Agr* **32**, 133-150.
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaino, N., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Igual, J. M. y Willems, A. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1985-1989.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E. y Velázquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2631-2637.
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. y Eardly, B. D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 13-22.
- Van Berkum, P. y Eardly, B. D. (2002). The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1132-1136.
- van Berkum, P., Elia, P., Eardly, B. D. (2006). Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of Medicago-nodulating rhizobia. *J Bacteriol* **188**, 5570-5577.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W. M., de Vos, P. y Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol* **25**, 507-512.
- Vandamme, P. y Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2285-2289.
- Vargas, C., Muniz de Padua, V. L., E., D. M. N., Vinagre, F., Masuda, H. P., Rodrigues da Silva, F., Baldani, J. I., Cavalcanti Gomes Ferreira, P. y Silva Hemeryly, A. (2003). Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: A genomic approach. *Symbiosis* **35**, 159-180.
- Velázquez, E., Martínez-Romero, E., Rodríguez-Navarro, D. N., Trujillo, M. E., Daza, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y van Berkum, P. (2001). Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1008-1010.
- Velázquez, E., Silva, L. R. y Peix, A. (2010). Legumes: a healthy and ecological source of flavonoids. *Curr Nutr Food Sci* **6**, 109-144.
- Velázquez, E., Valverde, A., Rivas, R., Gomis, V., Peix, A., Gantois, I., Igual, J. M., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E. (2010). Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **97**, 363-376.
- Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Mauré, L., Escarré, J., Béna, G., Brunel, B. y Cleyet-Marel, J. C. (2009). *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 850-855.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, U.K.: Blackwell Scientific Publications.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D. y Martínez-Romero, E. (2005a). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic

genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 569-575.

Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J. y Martínez-Romero, E. (2005b). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology* **28**.

Wang, E. T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X. y Martínez-Romero, E. (1998). *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**, 687-699.

Wang, E. T., Rogel, M. A., Garcia-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A. y Martínez-Romero, E. (1999a). *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**, 1479-1491.

Wang, E. T., van Berkum, P., Sui, X. H., Beyene, D., Chen, W. X. y Martínez-Romero, E. (1999b). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 1**, 51-65.

Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B. y Martínez-Romero, E. (2002). *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1687-1693.

Wang, F. Q., Wang, E. T., Liu, J., Chen, Q., Sui, X. H., Chen, W. F. y Chen, W. X. (2007). *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1192-1199.

Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E. y Chen, W. X. (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2231-2239.

Wei, H. G., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z. y Chen, W. X. (2003). Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1575-1583.

Welsh, J. y McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213-7218.

Wernegreen, J. J. y Riley, M. A. (1999). Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molec Biol Evol* **16**, 98-113.

Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1207-1217.

Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**, 6531-6535.

Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. y Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**, 315-326.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.

Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. y Fan, H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 706-711.

Yao, Z. Y., Kan, F. L., Wang, E. T., Wei, G. H. y Chen, W. X. (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2219-2230.

Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and

Allorhizobium undicola de Lajudie *et al.*. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 89-103.

Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.*. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.*. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems *et al.*. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 2107-2110.

Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. En *Biological fixation*, pp. 43-79. Edited by G. Stacey, Burris, H.R., Evans, H.J. New York (USA): Chapman and Hall.

Zaman-Allah, M., Sifi, B., L'Taief, B., El Aouni, M. H. y Drevon, J. J. (2007). Rhizobial inoculation and p fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. *Exp. Agricult.* **43**, 67-77.

Zehr, J. P., Wyman, M., Miller, V., Duguay, L. y Capone, D. G. (1993). Modification of the Fe Protein of Nitrogenase in Natural Populations of *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 669-676.

Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1893-1900.

Zurdo-Piñero, J. L., Rivas, R., Trujillo, M. E., Vizcaíno, N., Carrasco, J. A., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007). *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 784-788.

Zurdo-Piñero, J. L., García-Fraile, P., Rivas, R., Peix, A., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. y van Berkum, P. (2009). Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium mellotii* isolates from mainland Spain. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2354-2359.

AGRADECIMIENTO

A Dios: por ser el nuestro padre celestial que nos dio la vida y por ende la capacidad para adquirir nuevos conocimientos.

A mis padres, mis hermanos y mi Hijo Cesar Lisandro: por confiar siempre en mí y permitirme que le abandone por tanto tiempo.

A la AECID: Por darme la oportunidad de obtener nuevos conocimientos en mi vida profesional, gracias a la concesión de dos proyectos de investigación del plan PCI: *A/4824/06* y *A/7473/07*

A la UASD: Por enviarme a capacitar a España y de esa manera aportar los conocimientos adquiridos en nuestra querida Republica Dominicana.

A la Universidad de León, España: por facilitarme sus instalaciones (residencia y laboratorios del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad) y Profesores en pro de mi desarrollo personal y de nuestro país, la Republica Dominicana.

A la Universidad de Salamanca, España: por cederme sus laboratorios y poder contar con su inestimable equipo humano, que han sido claves en la adquisición del conocimiento adquirido.

A mis Tutores y Directores de tesis Dra. Encarna Velazquez de la Universidad de Salamanca y al Dr. Fernando González- Andrés de la Universidad de León: a ustedes les doy las gracias por su dedicación y entrega para que hoy pueda hacerse realidad mi sueño de realizar con éxito nuestra investigación.

A los Colaboradores y amigos Daniel Mulas, Beatriz Urbano, Paula García Fraile, Raúl Rivas, Antonio Morán y Pedro Casquero: a ustedes mil gracias por facilitarme las herramientas necesarias para que hoy pueda salir airoso en esta investigación.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio en España: Daniel Blanco, Nuria Seijas, Noemí de la Iglesia, Piedad Campelo, Luis Fernando Calvo, Álvaro Lobato, Bonifacio Reinoso, Doña Tina, Manoli, entre otros: A ustedes muchas gracias por darme su apoyo de una forma desinteresada.

A mis amigos y Colaboradores en Republica Dominicana: Jaime del Orbe, Amílcar Rodríguez, Luis Garrido, Marcia Corporan, Felipe Vicioso, Antonio Cuevas y Ángel Pimentel: Les doy las gracias por darme todo su apoyo y preocuparse siempre para que yo termine con éxito nuestra investigación.

A la Familia Mulas García: por acogerme en su casa como un hijo de la misma y darme todo el apoyo que necesite durante mi estancia en España, a ustedes mil gracias.