



Universidad de León

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

Caracterización y selección de rizobios que nodulan alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en la I.G.P. "Alubia de La Bañeza – León"

TESIS DOCTORAL

Daniel Mulas García

2010

RESUMEN

La alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo tradicional en el noroeste de Castilla y León, lo que ha llevado a la diferenciación de variedades locales de alubia, conocidas por su calidad. El producto recibió en 2005 la marca de calidad Indicación Geográfica Protegida "Alubia de La Bañeza - León" (IGP). La inoculación de leguminosas con bacterias del suelo con capacidad para la fijación de nitrógeno atmosférico (N₂) ha sido practicada ampliamente en agrosistemas de muchos lugares del mundo, pero el cultivo de la alubia es conocido por la errática nodulación y la escasa respuesta a nivel de rendimiento. La inoculación de alubia con cepas de rizobio adaptadas a las condiciones ambientales del cultivo se plantea como una solución viable para un cultivo más competitivo debido a la reducción de la fertilización, además del beneficio ambiental asociado a la reducción de aporte de fertilizantes.

El objetivo de este estudio fue la selección de rizobios de la IGP con elevada eficiencia de fijación de N₂ y adaptación a las condiciones ambientales locales, orientada a su empleo como inoculantes. Para ello, se recogieron nódulos en varias zonas, y los aislados obtenidos se caracterizaron fenotípicamente y genotípicamente. Los rizobios con capacidad infectiva fueron sometidos a una selección secuencial basada en la eficiencia de fijación de N₂. La primera selección se realizó en cultivo hidropónico en cámara de crecimiento. Posteriormente se realizó una selección en condiciones de microcosmos y en tercer lugar en condiciones de campo sobre suelos de la IGP. El experimento de campo se estableció con cepas de elevada eficiencia de fijación de N₂ frente a testigos sin fertilizar y fertilizados con N, en diferentes ambientes (año y localidad) y bajo diferentes sistemas de laboreo (laboreo convencional, laboreo convencional seguido de siembra y enterrado parcial de centeno y siembra directa). Partiendo de 48 aislados, la selección en el cultivo hidropónico redujo el número de aislados a cinco y a partir del microcosmos se seleccionaron tres, que fueron los analizados en el experimento de campo.

La mayor parte de los rizobios se clasificaron en el grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum* y se obtuvieron en menor medida aislados identificados como *R. giardinii*, originarios de una zona de menor tradición del cultivo. La variabilidad fenotípica de los aislados fue relativamente alta. La mayor eficiencia de fijación de N₂ se observó en los aislados LCS0306, LBM1123 y ZBM1008 (provenientes de la Cepeda, La Bañeza y Benavente respectivamente), de la especie *R. leguminosarum*. En el experimento de campo se analizaron el rendimiento de semilla y los componentes del rendimiento, resultando recomendable la inoculación de la alubia en las condiciones ambientales del noroeste de Castilla y León en sistemas de laboreo convencional con rizobios locales seleccionados, frente a laboreos de conservación, como la siembra directa. En la siembra directa no se observó ninguna respuesta positiva de la inoculación. Las temperaturas bajas durante el ciclo del cultivo pueden afectar negativamente al cultivo de la alubia en el noroeste de Castilla y León.

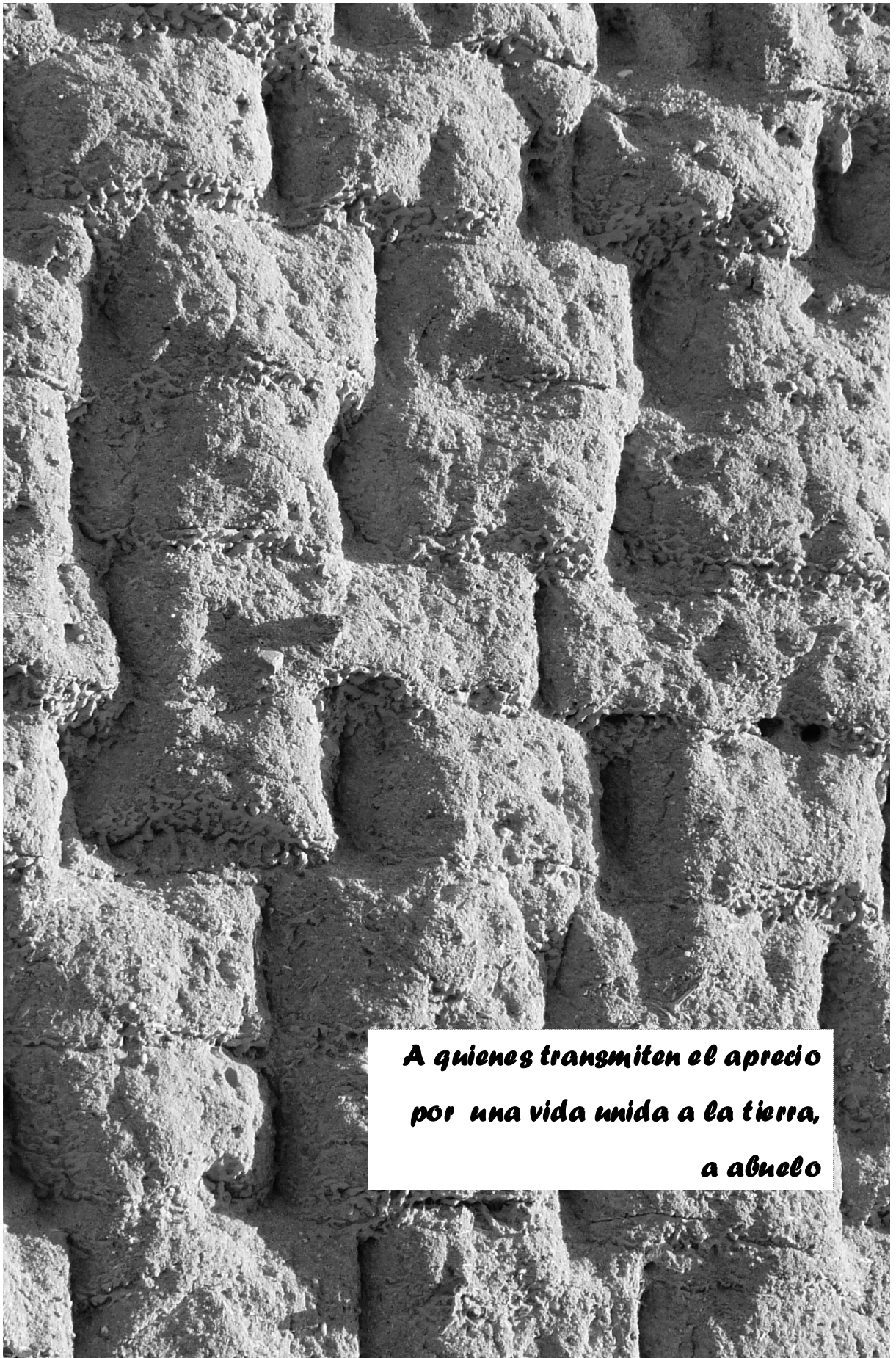
ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a traditional crop in NW Castilla y León, and this has led to the differentiation of local common bean varieties, known for their quality. This was recognized in 2005 with the official quality brand Geographical Protected Indication 'Alubia de La Bañeza - León' (GPI). While legume inoculation with soil bacteria able to fix atmospheric nitrogen (N₂) has been widely adopted in many agrosystems throughout the world, in the case of *P. vulgaris* L., a lack of yield response to inoculation is common. Isolating local rhizobia, adapted to their environment, to use as inoculants has been suggested as a strategy to overcome poor nodulation and nitrogen fixation resulting in higher yielding crops and a reduction in fertilizer inputs.

This study aimed to select local rhizobia from the GPI based on their N₂ fixation efficiency and adaptation to the edaphic conditions of NW Castilla y León in order to utilize them as inoculants. To achieve this aim, nodules were obtained from soils throughout the GPI, and the isolates were characterised genotypically and phenotypically. Infective strains were screened for their N₂ fixation ability in hydroponic culture conditions and promising isolates further screened in glasshouse trials.

Field trials were carried out with high N₂ fixation efficiency strains in different environments (year-location) and under different tillage systems (conventional tillage, conventional tillage with a rye biomass cover and no tillage). Seed and biomass yield of bean plants were analyzed from the field experiments. From an initial forty-eight strains, five isolates were chosen from the hydroponic trials, which were then tested in the glasshouse and finally three isolates were chosen for field trial.

Most isolates were identified within the phylogenetic cluster of *Rhizobium leguminosarum* while a number were classified as *R. giardinii*, isolated from soils that had no previous history of *P. vulgaris* L. cropping. Their phenotypic variability was relatively high. The highest N₂ fixation efficiency was observed within the *R. leguminosarum* isolates LCS0306, LBM1123 and ZBM1008, from Cepeda, La Bañeza and Benavente respectively. Results show that inoculation with the selected local rhizobia is recommended for common bean cropped in the environmental conditions of NW Castilla y León under conventional tillage. In contrast, no response to inoculation could be shown in no tillage trials. Moreover, it was shown that low temperatures occurring during the growth cycle of the common bean can adversely affect the yield of this crop in NW Castilla y León.



***A quienes transmiten el aprecio
por una vida unida a la tierra,
a abuelo***

ÍNDICE GENERAL

1. ANTECEDENTES	1
1.1. Las leguminosas	3
1.1.1. Aprovechamiento de las leguminosas	4
1.1.2. La alubia (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5
1.2. La alubia en la agricultura de Castilla y León.....	10
1.2.1. Características de la agricultura en Castilla y León y perspectivas de futuro	10
1.2.2. Las leguminosas en la agricultura de Castilla y León	11
1.2.3. La alubia en el noroeste de Castilla y León	12
1.3. Los rizobios	15
1.3.1. Origen del estudio y taxonomía de los rizobios.....	15
1.3.2. Los rizobios que nodulan <i>Phaseolus</i>	18
1.3.3. Establecimiento de la relación simbiótica entre la leguminosa y el rizobio....	18
1.3.4. Importancia de la biodiversidad y estudio de los rizobios	21
1.3.5. Estudios de biodiversidad y caracterización de rizobios.....	22
1.4. De la fijación biológica de nitrógeno al desarrollo de inoculantes microbianos	24
1.4.1. El ciclo del nitrógeno y la fijación de N ₂ atmosférico.....	24
1.4.2. Evolución de la industria de los inoculantes	26
1.4.3. Marco legal de los inoculantes en España y en el mundo.....	29
1.4.4. Ejemplo de la investigación y desarrollo en inoculantes en Brasil	31
1.4.5. El laboreo de conservación y su relación con la fijación biológica de N ₂	32
1.4.6. Tendencias en la investigación y el desarrollo de inoculantes	34
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Obtención de aislados.....	43
3.1.1. Recogida y conservación de nódulos de alubia	43
3.1.2. Aislamiento y conservación de los aislados bacterianos	44
3.2. Caracterización genotípica.....	44
3.2.1. Extracción y purificación del ADN	44
3.2.2. Amplificación del ADN para obtener perfiles de TP-RAPD	45
3.2.3. Amplificación del gen ribosómico 16S, el espaciador intergénico 16S-23S rDNA y los genes <i>recA</i> , <i>atpD</i> y <i>nodC</i>	46
3.2.4. Electroforesis del ADN.....	48
3.2.5. Secuenciación de fragmentos de ADN	48
3.2.6. Análisis de las secuencias de ADN	49
3.3. Análisis de las características fenotípicas	49
3.3.1. Crecimiento en diferentes condiciones de pH, salinidad y temperatura.....	49

3.3.2. Resistencia Natural a Antibióticos	50
3.3.3. Utilización de Fuentes de Carbono y Nitrógeno.....	50
3.3.4. Bioquímica	52
3.3.5 Agrupamiento fenotípico.....	53
3.4. Análisis de la infectividad y eficiencia de fijación de N ₂ en cultivo hidropónico....	54
3.4.1. Producción y cultivo de plantas de alubia en cultivo hidropónico estéril.....	54
3.4.2. Inoculación de las plantas con los aislados	55
3.4.3. Análisis de la eficiencia de fijación de N ₂ de cada aislado	55
3.4.4. Segunda fase del análisis de la eficiencia de fijación de N ₂ en cultivo hidropónico.....	57
3.5. Selección de los aislados en condiciones de microcosmos	57
3.5.1. Elección de los suelos para el experimento de microcosmos.....	58
3.5.2. Análisis de suelos y fertilización	58
3.5.3. Diseño experimental del microcosmos	61
3.5.4. Actividades durante el crecimiento de alubia en microcosmos	63
3.5.5. Análisis de datos	63
3.6. Experimento de campo.....	64
3.6.1. Diseño experimental	64
3.6.2. Condiciones ambientales de los años 2008 y 2009	69
3.6.3. Actividades del experimento de campo	71
3.6.4. Toma y análisis de los datos	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.1. Obtención de una colección de aislados bacterianos a partir de nódulos.....	77
4.2. Caracterización molecular	81
4.2.1. Análisis de los perfiles de TP-RAPD.....	81
4.2.2. Secuenciación y análisis filogenético de genes cromosómicos.....	84
4.2.3. Secuenciación y análisis del gen <i>nodC</i>	97
4.3. Análisis de las características fenotípicas.....	101
4.3.1. Crecimiento en diferentes condiciones de pH, salinidad y temperatura	101
4.3.2. Resistencia natural a antibióticos	102
4.3.3. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno	107
4.3.4. Producción de ureasa, celulasa y almidón.....	112
4.3.5. Solubilización de fosfato	112
4.3.6. Otras actividades enzimáticas	115
4.3.7. Agrupamiento fenotípico.....	115
4.4. Infectividad y eficiencia de fijación de N ₂ en medio hidropónico estéril.....	120
4.4.1. Estudio de la eficiencia de fijación de N ₂ de 48 aislados bacterianos	120
4.4.2. Estudio de la eficiencia de fijación de N ₂ de 18 aislados bacterianos preseleccionados	126
4.4.3. Discusión del experimento en cultivo hidropónico	127

4.5. Selección de los aislados de elevada eficiencia de fijación de N ₂ en condiciones de microcosmos	128
4.5.1. Número Más Probable de los sustratos.....	128
4.5.2. Análisis de los resultados	129
4.5.3. Discusión de los resultados del experimento de microcosmos.....	142
4.6. Experimento de campo	144
4.6.1. Análisis de la varianza combinado de ambientes y tratamientos.....	145
4.6.2. Análisis de las interacciones entre variables independientes	149
4.6.3. Discusión de los resultados del experimento de campo.....	160
5. CONCLUSIONES	165
AGRADECIMIENTOS.....	169
6. REFERENCIAS	171

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de producción de alubia para grano en algunas regiones del norte de España	9
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los rizobios.....	16
Tabla 3. Características del suelo de las parcelas de origen de los nódulos.....	43
Tabla 4. Medio de cultivo YMA	44
Tabla 5. Medio de cultivo TY	45
Tabla 6. Reactivos empleados en la PCR de TP-RAPD	46
Tabla 7. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR para TP-RAPD	46
Tabla 8. Reactivos empleados en la PCR del ITS, <i>recA</i> , <i>atpD</i> y <i>nodC</i>	47
Tabla 9. Cebadores para la amplificación de ADN.....	47
Tabla 10. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR.....	48
Tabla 11. Antibióticos empleados en la prueba de resistencia	50
Tabla 12. Medio Bergensen modificado.....	51
Tabla 13. Fuentes de C y de N	51
Tabla 14. Sustratos para la evaluación de actividad enzimáticas	53
Tabla 15. Solución nutritiva libre de nitrógeno.....	55
Tabla 16. Análisis del suelo ESTIA en los años 2007, 2008 y 2009	59
Tabla 17. Análisis del suelo Sueros en los años 2007, 2008 y 2009	59
Tabla 18. Resumen del plan de fertilización P y K del microcosmos.....	61
Tabla 19. Actividades del experimento de campo en el ambiente ESTIA 2008	74
Tabla 20. Actividades del experimento de campo en los ambientes ESTIA - Sueros 2009	74
Tabla 21. Origen de los nódulos y aislados de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León"	79
Tabla 22. Historial de cultivo de los suelos de origen de los nódulos	79
Tabla 23. Origen y codificación de los aislados bacterianos.....	80
Tabla 24. Perfiles de TP-RAPD de los aislados de este estudio	83
Tabla 25. Porcentajes de identidad del gen ribosómico 16S de distintas cepas de referencia con los aislados	87
Tabla 26. Porcentajes de identidad del gen <i>recA</i> de cepas de referencia de <i>Rhizobium</i> con los aislados.....	91
Tabla 27. Porcentajes de identidad del gen <i>atpD</i> de cepas de referencia de <i>Rhizobium</i> con los aislados.....	92
Tabla 28. Porcentaje de identidad del ITS de cepas de referencia de <i>Rhizobium</i> con los aislados.....	95

Tabla 29. Porcentaje de identidad del gen <i>nodC</i> de cepas de referencia de <i>Rhizobium</i> con el de los aislados.....	100
Tabla 30 Crecimiento de los aislados a diferentes temperaturas, concentraciones de NaCl y valor de pH del medio	103
Tabla 31. Resistencia a antibióticos de los aislados	106
Tabla 32. Utilización de fuentes de carbono por las cepas de referencia y los aislados.....	109
Tabla 33. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno por las cepas de referencia y los aislados	111
Tabla 34. Actividad ureasa, celulasa y amilasa y solubilizadora de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de los aislados y cepas de referencia.....	114
Tabla 35. Otras actividades enzimáticas.....	116
Tabla 36. ANOVA de las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en cultivo hidropónico para los tratamientos de inoculación con 48 aislados y los controles sin inocular con y sin N	120
Tabla .37. Valores medios de las variables dependientes del experimento de alubia Riñón en cultivo hidropónico para los tratamientos de inoculación y su comparación con el valor más elevado de cada variable dependiente	121
Tabla 38. Valores medios de las variables dependientes del experimento de alubia Riñón en cultivo hidropónico para los tratamientos de inoculación y su comparación con el valor más reducido de cada variable dependiente.	123
Tabla 39. Valor medio del N en la biomasa aérea de cada aislado y su eficiencia de fijación de N_2 respecto al control con N.....	126
Tabla 40. ANOVA de las variables dependientes analizadas en el experimento de cámara de crecimiento con 18 aislados de elevada eficiencia de fijación de N_2	126
Tabla 41. Valores medios de las variables dependientes analizadas en la segunda fase del experimento de eficiencia en la fijación de N_2 y comparación de medias respecto al aislado LEV0613 para el contenido de N en la biomasa aérea.....	127
Tabla 42. Presencia y ausencia de nodulación del experimento del Número Más Probable	129
Tabla 43. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en microcosmos considerando como variables independientes el año, el suelo y el tratamiento de inoculación	130
Tabla 44. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en microcosmos considerando como variables independientes el suelo y el tratamiento de inoculación para cada uno de los años 2007, 2008 y 2009.....	131
Tabla 45. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en microcosmos durante 2007, 2008 y 2009 para las variables independientes año, suelo y tratamiento de inoculación	132

Tabla 46. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en microcosmos para las variables independientes año y tratamiento de inoculación, en cada suelo	135
Tabla 47. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en microcosmos para la variable independiente tratamiento de inoculación, en cada año y en cada suelo.....	136
Tabla 48. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en tres ambientes diferentes	146
Tabla 49. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en el ambiente ESTIA 2008.....	147
Tabla 50. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en el ambiente ESTIA 2009.....	147
Tabla 51. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en el ambiente Sueros2009.....	148
Tabla 52. Comparación de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en campo para los ambientes, los tipos de laboreo y los tratamientos de inoculación.....	148
Tabla 53. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en campo durante 2008 y 2009 para los tratamientos de inoculación por tipo de laboreo en campo los años 2008 y 2009	150
Tabla 54. Comparaciones de valores medios de las variables dependientes para los tratamientos de laboreo e inoculación en ESTIA 2008	157
Tabla 55. Comparaciones de valores medios de las variables dependientes para los tratamientos de laboreo e inoculación en ESTIA 2009	158
Tabla 56. Comparaciones de valores medios de las variables dependientes para los tratamientos de laboreo e inoculación en Sueros 2009	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Familia Leguminosae.....	3
Figura 2. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	5
Figura 3. Producciones de alubia para grano por los principales países en el mundo entre 2005 y 2008.	8
Figura 4. Evaluación de las superficies, rendimientos y producciones totales de alubia grano en España 2000-2008	8
Figura 5. Cultivo de la alubia en el noroeste de Castilla y León.....	13
Figura 6. "Alubia de La Bañeza - León". Variedades de alubia	14
Figura 7. Inicio de la nodulación.....	20
Figura 8. Tipos de Nódulo.....	21
Figura 9. Funcionamiento del complejo de la nitrogenasa	21
Figura 10. Ciclo biogeoquímico del N simplificado.....	24
Figura 11. Inoculantes comerciales.....	28
Figura 12. Experimentos de evaluación de inoculantes en guisante y altramuz en Australia.....	35
Figura 13. Distribución temporal de las actividades realizadas en la cámara durante el cultivo de cada una de las tandas de plantas de alubia.	56
Figura 14. Disposición del experimento de microcosmos 2007	62
Figura 15. Disposición de los experimentos de microcosmos 2008 y 2009	63
Figura 16. Mapa de localización de la ESTIA (León) y Sueros de Cepeda	65
Figura 17. Imagen de la localización de la parcela en la ESTIA (León).....	66
Figura 18. Imagen de la localización de la parcela en Sueros de Cepeda (León).....	66
Figura 19. Disposición del experimento de campo en las localizaciones de sueros y ESTIA	68
Figura 20. Experimento de campo en la localización de ESTIA 2008.....	68
Figura 21. Dimensiones y disposición de la parcela principal (bloque) y subparcelas en el experimento de campo	69
Figura 22. Precipitación media en el observatorio de León en el período 1970-2001 (Precip) y precipitaciones mensuales en 2008 y 2009 (P 2008 y P 2009)	69
Figura 23. Temperaturas medias de los meses de mayo a septiembre 2008 y 2009 y del período 1970-2001 (T med, TM y Tm) en el observatorio de León	70
Figura 24. Temperaturas máximas y mínimas diarias durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 y 2009 en el observatorio de León	70
Figura 25. Mapa de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León" sobre el cual se localiza el número de las parcelas visitadas	78

Figura 26. (A) campo de alubia en la IGP; (B) nódulos en raíz de alubia; (C) rizobio aislados en placa de YMA; (D) cultivo líquido de rizobio en caldo YMB.....	78
Figura 27. Perfiles de TP-RAPD de los aislados de este estudio.	82
Figura 28. Mapa de la IGP con los perfiles de TP-RAPD.....	84
Figura 29. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados y diferentes especies de los géneros <i>Rhizobium</i> , <i>Ensifer</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	86
Figura 30. Análisis filogenético del gen <i>recA</i> de los aislados y diferentes especies del género <i>Rhizobium</i>	89
Figura 31. Análisis filogenético del gen <i>atpD</i> de los aislados y diferentes especies del género <i>Rhizobium</i>	90
Figura 32. Análisis filogenético del ITS de los aislados y diferentes especies del género <i>Rhizobium</i>	94
Figura 33. Análisis filogenético del gen <i>nodC</i> de los aislados y diferentes especies del género <i>Rhizobium</i>	99
Figura 34. Pruebas fenotípicas de los aislados y las cepas de referencia.....	113
Figura 35. Dendrograma resultante del agrupamiento fenotípico.....	119
Figura 36. Valores medios del IC por año y suelo en el experimento de microcosmos.	138
Figura 37. Valores medios del número de semillas por vaina por año y suelo en el experimento de microcosmos.	138
Figura 38. Valores medios del peso de 1000 semillas (g) por año y suelo en el experimento de microcosmos.	139
Figura 39. Valores medios del peso de semillas (g planta ⁻¹) por año y suelo en el experimento de microcosmos.	139
Figura 40. Valores medios del N acumulado en semillas (mg planta ⁻¹) por año y suelo en el experimento de microcosmos.	140
Figura 41. Valores medios de la biomasa aérea (g planta ⁻¹) por tratamiento de inoculación y suelo en el microcosmos.....	141
Figura 42. Valores medios del índice de cosecha por tratamiento de inoculación y suelo en el microcosmos.	141
Figura 43. Valores medios del N total en semillas (mg planta ⁻¹) por tratamiento de inoculación y suelo en el microcosmos.	142
Figura 44. Experimento de campo.....	144
Figura 45. Valores medios de la biomasa aérea (g) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes.....	151

Figura 46. Valores medios del índice de cosecha para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes.....	152
Figura 47. Valores medios del número de vainas por planta para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes	152
Figura 48. Valores medios del número de semillas por vaina para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes	153
Figura 49. Valores medios del peso de 1000 semillas (g) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes	153
Figura 50. Valores medios del rendimiento (g m^{-2}) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes.....	154
Figura 51. Valores medios del N acumulado en semillas (mg planta^{-1}) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes.....	154
Figura 52. Valores medios de la bimoasa aérea (g) para los distintos ambientes por tratamiento de inoculación. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes.....	155
Figura 53. Valores medios de la biomasa aérea (g) para los distintos laboreos por tratamiento de inoculación. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre laboreos	156
Figura 54. Valores medios del número de vainas para los distintos laboreos por tratamiento de inoculación. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre laboreos	156

1. ANTECEDENTES

1.1. Las leguminosas

La familia Leguminosae o Fabaceae (figura 1) comprende un gran número de géneros de plantas angiospermas, tanto de porte leñoso, como arbustivo y herbáceo, anuales, bienales o perennes, que se agrupan en tres subfamilias: Caesalpinoideae, Mimosoideae y Faboideae o Papilionoideae. Además de estas subfamilias, la familia de las leguminosas también incluye dos tribus Cercideae, Detarieae y el género *Duparquetia*. Esta familia comprende unos 750 géneros y entre 16000 y 19000 especies, distribuidas por todo el mundo, siendo la segunda familia en importancia económica tras la Gramineae y en número sólo superada por las Compositae y la Orchidaceae (Allen & Allen, 1981).

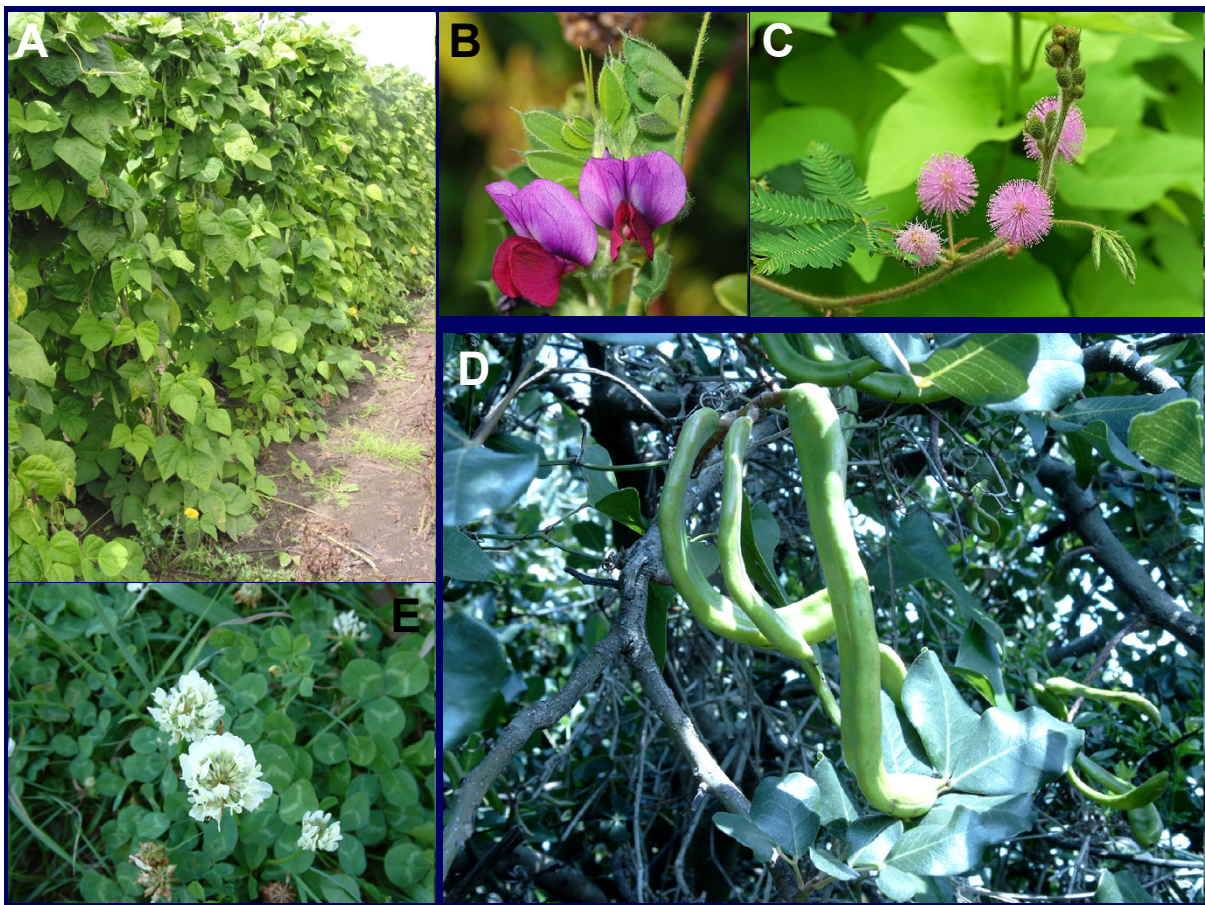


Figura 1. Familia Leguminosae: (A) *Phaseolus vulgaris* L.; (B) *Vicia sativa* L.; (E) *Trifolium repens* L. (subfamilia Faboideae); (C) *Mimosa pudica* L. (subfamilia Mimosoideae); (D) *Ceratonia siliqua* L. (subfamilia Caesalpinoideae)

Una característica común a todas las leguminosas es su fruto, una legumbre con diversas modificaciones cuya función es la dispersión de la semilla, ya sea independientemente o asociada a animales, agua o viento. Una característica general de la familia Leguminosae es su capacidad para establecer una relación simbiótica con bacterias del suelo denominadas rizobios, que se traduce en un intercambio de sustancias nutritivas. La bacteria, una vez desarrollados los nódulos radiculares en las plantas, está en condiciones de tomar nitrógeno (N_2) atmosférico y fijarlo en forma de aminoácidos, mientras que la planta puede nutrir con carbohidratos a la bacteria en el nódulo (Castrovejo *et al.*, 1986).

La subfamilia Caesalpinioideae incluye géneros como *Ceratonia*, *Senna*, *Caesalpinia* y *Chamaechrista*, con especies arbóreas, arbustivas o herbáceas de zonas cálidas o templadas.

La subfamilia Faboideae es la que más géneros y especies aporta a la familia de las leguminosas y se encuentra distribuída por prácticamente todas las zonas del planeta. Esta subfamilia contiene especies leñosas, más frecuente en zonas cálidas, y especies herbáceas, que se distribuyen por todos los territorios. La característica común de esta subfamilia es la flor, con forma de mariposa, de ahí el nombre alternativo de *Papilionoideae*. La flor está compuesta de cinco pétalos, el más representativo el estandarte, que sobresale superiormente a los cuatro. De estos cuatro los inferiores a veces están unidos, cerrando los estambres y el estilo. Las hojas suelen contener varios foliolos, más de tres, y la vaina suele ser bivalva y dehiscente, con una gran variedad de formas.

Las plantas incluidas en la subfamilia de las Mimosoideae son generalmente de zonas cálidas semiáridas, incluyendo entre los géneros de esta subfamilia el género *Mimosa*, *Acacia* o *Prosopis*. Por lo general son plantas de porte arbóreo, que en algunos casos llegan desarrollar plantas gigantescas (Castrovejo *et al.*, 1986).

1.1.1. Aprovechamiento de las leguminosas

Las leguminosas de interés para el hombre se encuentran dentro de las tres subfamilias mencionadas. La mayoría de las especies aprovechadas por el hombre para su alimentación a partir del fruto y la semilla (verde o seca) pertenecen a la subfamilia de las *Papilionodeae* (ILDIS, 2007), entre otros, los géneros *Arachis*, *Cajanus*, *Cicer*, *Glycine*, *Lathyrus*, *Lens*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Trifolium*, *Vicia* y *Vigna*. También se conoce el aprovechamiento de otras especies de las demás subfamilias de forma más testimonial (como *Leucaena* entre las *Mimosoideae* o *Cercis* en la subfamilia *Caesalpinioideae*). Otro aprovechamiento menos común entre las leguminosas es el de la raíz, como ejemplo el nabo mexicano, género *Pachyrhizus*, y el regaliz, género *Glycyrrhiza*.

También interesantes para el hombre aunque de forma indirecta, son las leguminosas utilizadas para la alimentación animal, bien cultivándolas o aprovechándose el forraje. Son destacables dentro de estas leguminosas los géneros *Trifolium*, *Medicago*, *Melilotus*, *Lotus*, *Lespedeza* y *Ornithopus*, bien en pastos naturales o resembrados.

Los usos industriales de las leguminosas son escasos, estando relacionados con la industria farmacéutica, que encuentra aprovechamiento de leguminosas de las tres subfamilias, como el tamarindo (género *Tamarindus*, subfamilia *Caesalpinioideae*), la industria alimentaria y la de los biocombustibles, como la soja (género *Glycine*, subfamilia *Papilionoideae*) o

Leucaena leucocephala (subfamilia Mimosoideae), o el uso por su madera, donde se pueden incluir numerosos géneros de leguminosas arbóreas.

1.1.2. La alubia (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.1.2.1. Origen de la alubia

Phaseolus vulgaris es una leguminosa de la subfamilia Papilionoideae, de porte herbáceo y ciclo anual, que recibe diferentes denominaciones en el lenguaje español, generalmente asociadas a demarcaciones geográficas, de forma que se conoce como alubia, judía, frijol, frejol, poroto, habichuela, etc (figura 2). Es cultivada en muchas zonas templadas y cálidas del planeta con la finalidad de aprovechar sus semillas como alimento, aunque también se utiliza su vaina cuando está en fase de llenado de la semilla.



Figura 2. *Phaseolus vulgaris* L.

El origen de *Phaseolus vulgaris* está en América, concretamente a lo largo de las cordilleras de América Central y de los Andes. Existen dos centros principales de domesticación de la alubia bien diferenciados, el Mesoamericano y el Andino. El primero comprende regiones de México, Guatemala, Honduras y noroeste de Colombia y el Andino se localiza al sur de

Perú, Bolivia y noroeste de Argentina (Gepts & Debouck, 1991). Un tercer posible centro de domesticación se ha sugerido en Colombia (Kami *et al.*, 1995). Se han encontrado cultivares silvestres de *Phaseolus vulgaris* desde México hasta el noroeste de Argentina, mientras que las más antiguas formas cultivadas datadas se encontraron entre el suroeste de EE.UU. y Argentina (datadas de hace 2300 años y 9000 años respectivamente) (Gepts & Debouck, 1991). Los estudios del tipo de faseolina y la morfología de la planta y la semilla establecen una separación entre los cultivares, de forma que en América Central predomina la faseolina tipo "S" y semillas de tamaños menores y de forma más redondeada frente a la zona de la cordillera de los Andes (noroeste de la actual Argentina, Bolivia, Perú), donde se encuentra la faseolina "T" y formas más elongadas. En Colombia aparecen ambos tipos de faseolina.

Posteriormente al descubrimiento de América, la alubia fue introducida en Europa. Ésta se comenzó a cultivar en España y de aquí pasó a extenderse por Europa (Graham & Ranalli, 1997), en especial en la Cuenca Mediterránea, debido a su adaptación a las condiciones edafoclimáticas de estos territorios. A partir de la entrada del cultivo en Europa, España ha sido uno de los países donde más extendido está. Tal es así, que la Península Ibérica ha supuesto un centro secundario de diversificación genética lejos de su origen (van Schoonhoven & Voysest, 1991; Santalla *et al.*, 2002)

Las variedades de alubia que en la actualidad se cultivan mayoritariamente en Europa provienen del centro de diversificación genética Andino. Estas variedades tienen como características diferenciadoras sus colores, cremosos, moteados rojizos, blancos y beige y su forma alargada. También en Europa, aunque en menor medida y como cultivos de zonas más marginales, se cultivan variedades de origen Mesoamericano, debido a su mayor tolerancia a estrés y su rusticidad (Santalla *et al.*, 2002).

1.1.2.2. Características del cultivo de *Phaseolus vulgaris*

Las formas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* son plantas de porte herbáceo, de ciclo anual y con hábitos de crecimiento determinado (tipo I) o indeterminado (tipos II, III y IV). Los hábitos indeterminados son aquéllos que presentan una tendencia al crecimiento trepador (Graham & Ranalli, 1997).

El cultivo de alubia es exigente en cuanto a fertilidad del suelo, y las causas más frecuentes del estrés nutricional son las carencias en algunos elementos en el suelo (en especial N, P, Mn, Mo y Zn). También puede darse estrés derivado de las condiciones ambientales, como estados hídricos extremos del suelo, especialmente al déficit durante la floración, temperaturas por encima de 30°C de día y de 20°C de noche conllevan una limitación de la producción, o muy bajas, continuamente por debajo de 10°C o heladas puntuales que afectan negativamente a la producción (Graham & Ranalli, 1997), o un fotoperíodo

inadecuado, ya que, generalmente, las variedades originarias de latitudes extratropicales son con mayor frecuencia sensibles al fotoperíodo (White & Laing, 1989).

También existen diferentes causas de estrés de tipo biótico, entre las que destacan las enfermedades causadas por bacterias (grasa, causada por *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola), hongos (*Sclerotinia sclerotirum*, *Fusarium* sp, *Rhizoctonia solani*, etc.), virus, nematodos y plagas de insectos (pulgón, araña roja, mosca blanca, trips, etc.). Una incidencia frecuente en muchos lugares es el "mal de pie" de la alubia, originado por un complejo de hongos contra el que se propuso el control con fungicidas debido al éxito en la experimentación (Campelo *et al.*, 2007). Otro tipo de estrés biótico en el cultivo de las alubias es la presencia de plantas adventicias, cuya comunidad está sujeta a una enorme variabilidad, en la que influyen factores como el historial de las rotaciones de cultivos, el sistema de laboreo, las condiciones edafoclimáticas del lugar de cultivo o los cultivos circundantes.

La alubia cultivada para grano normalmente finaliza su ciclo de desarrollo entre 90 y 120 días, momento en el que se recoge el grano con cosechadora o la totalidad de la parte aérea de las plantas, generalmente por la mañana, para evitar la apertura de las vainas, y se desgrana posteriormente.

La alubia constituye la principal fuente de proteínas para la población humana de numerosos países, en especial países en desarrollo de Sudamérica, África y Asia, de forma que junto con la soja, constituye el 33% del N proteico diario (Graham & Vance, 2003). Igualmente supone un pilar fundamental de la alimentación en países desarrollados, en especial de la cuenca mediterránea, aunque con distinta incidencia en las dietas en función de las costumbres. Además, el aumento en estos países del consumo de alimentos procesados hace que las alubias tengan nuevas oportunidades de utilización.

Precisamente por ser cultivada en muchos países en desarrollo, el cultivo más extendido se produce en pequeñas extensiones, en ocasiones marginales, en condiciones de escasa o nula fertilización, y bajo condiciones ambientales subóptimas para su cultivo. Además el cultivo de la alubia es comunmente un cultivo asociado a otro de otra familia botánica, en general gramíneas, como el maíz (Francis *et al.*, 1982).

1.1.2.3. Importancia del cultivo de la alubia

El cultivo de la alubia para grano es diferente del cultivo de la alubia de verdeo. Así, la extensión y producción también son diferentes. Los principales países productores de alubia para grano se observan en la figura 3. India, Brasil, Birmania, China y los EE.UU. fueron los principales productores de alubia para grano en 2007. España, Italia y los EE.UU. aparecieron ese año entre los principales productores de vaina verde, aunque a gran

distancia de China e Indonesia (datos no mostrados). La evolución de la producción de alubia para grano refleja un descenso de la producción en China, frente a una tendencia creciente en India y Brasil y no tan acentuada en México.

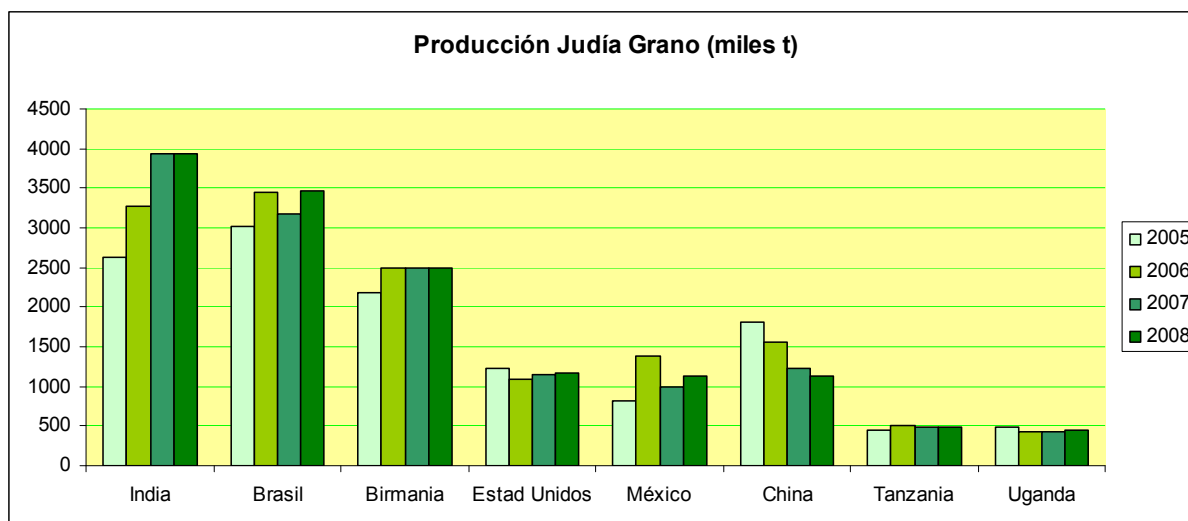


Figura 3. Producciones de alubia para grano por los principales países en el mundo entre 2005 y 2008 (FAOStat, 2010).

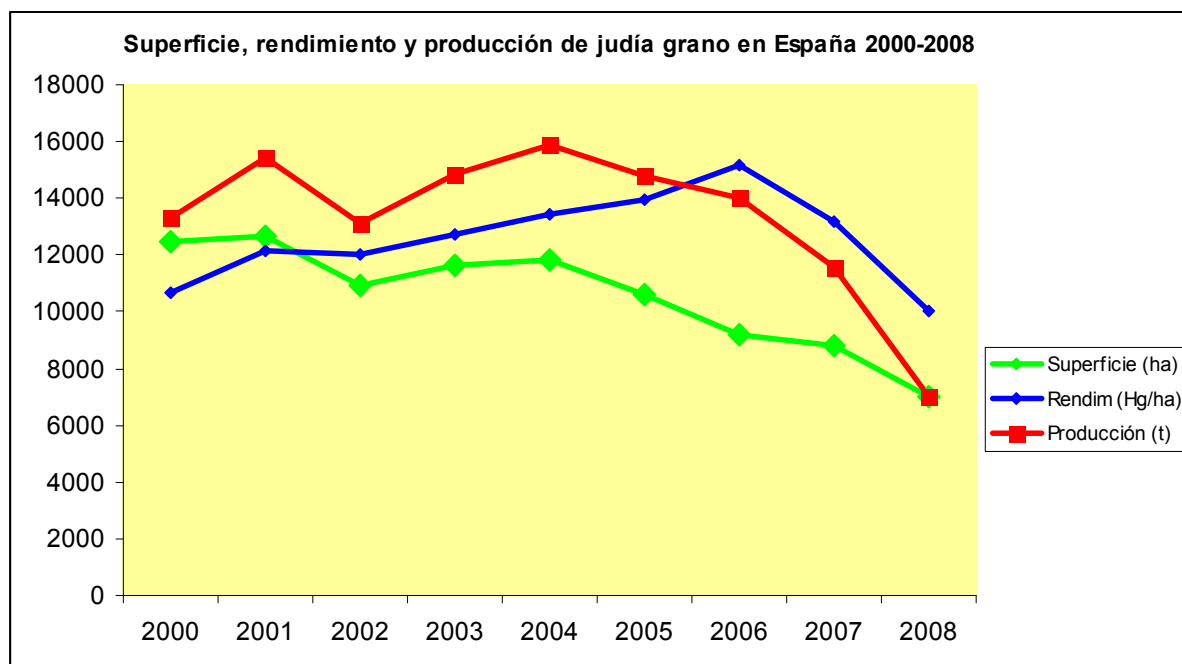


Figura 4. Evaluación de las superficies, rendimientos y producciones totales de alubia grano en España 2000-2008 (FAOStat, 2010)

En España ha habido una reducción progresiva de la superficie cultivada desde los inicios del siglo XXI, algo que se iba compensando en producción con unos rendimientos ligeramente al alza, aunque en 2007 y 2008 la reducción de los rendimientos junto con la lenta recesión en la superficie cultivada llevó a una caída pronunciada de la producción (figura 4), desde aproximadamente 16000 t en 2004 a unas 11000 t en 2007 y 8000 t en 2008. Este hecho puede ser consecuencia de una reducción de los riegos en estos dos

últimos años por las reducciones en los niveles de los pantanos que sostienen los regadíos, debido a la sequía arrastrada año tras año.

La producción española de judía grano está dispersa por toda la geografía nacional, pero las principales provincias productoras de judía grano se localizan en el noroeste de la península. Las comunidades autónomas de Galicia, Asturias y Castilla y León produjeron en 2007 casi el 76% del total nacional, y con el País Vasco, Navarra y La Rioja alcanzan el 85% de la producción nacional (tabla 1; MAPA, 2008). A nivel provincial, sólo León y La Coruña superaron las 1000 t de producción de grano.

Tabla 1. Datos de producción de alubia para grano en algunas regiones del norte de España

Provincia /C.A./País	Superficie (ha)			Rendimiento (kg ha ⁻¹)		Producción (t)
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	
La Coruña	1356	72	1428	896	1467	1321
Lugo	579	31	610	1106	1637	691
Orense	270	14	284	1031	1616	301
Pontevedra	336	18	354	1033	1457	373
GALICIA	2541	135	2676	976	1520	2686
P. DE ASTURIAS	1170	70	1240	588	1000	757
Álava	126	–	126	746	–	94
Guipúzcoa	275	–	275	700	–	193
Vizcaya	215	5	220	830	1350	185
PAÍS VASCO	616	5	621	755	1350	472
NAVARRA	41	111	152	850	2545	317
LA RIOJA	–	123	123	–	1500	185
Ávila	2	269	271	900	1900	513
Burgos	–	57	57	–	2200	125
León	–	1900	1900	–	1900	3610
Palencia	24	96	120	1500	1500	180
Salamanca	10	22	32	1500	1890	57
Segovia	4	–	4	800	–	3
Soria	–	3	3	–	1800	5
Valladolid	19	117	136	600	1800	222
Zamora	–	109	109	–	2200	240
CASTILLA Y LEÓN	59	2573	2632	1142	1900	4955
ESPAÑA	4601	3906	8507	837	1852	11085

La reducción de superficies y producciones puede ser debida a tres causas que mencionaron Reinoso Sánchez *et al.* (2007), que son la disminución de la rentabilidad del cultivo, las importaciones a precios más reducidos y los problemas fitosanitarios del cultivo. A su vez, la baja rentabilidad del cultivo se atribuyó a la desorganización del sector productor, la inestabilidad de los precios, la no inclusión de este cultivo en las ayudas a cultivos herbáceos de la Política Agraria Comunitaria de la Unión Europea y la falta de homogeneidad en las variedades.

1.2. La alubia en la agricultura de Castilla y León

1.2.1. Características de la agricultura en Castilla y León y perspectivas de futuro

Entre los factores físicos que condicionan la agricultura de Castilla y León se encuentran el territorio y el clima. Castilla y León, con 94224 km² de extensión, se asienta en su mayor parte sobre una meseta que está rodeada de cadenas montañosas (Cordillera Cantábrica, Montes de León y Sistemas Ibérico y Central). El clima es de tipo continental, con temperaturas extremas y una gran estacionalidad de las precipitaciones. La influencia del océano Atlántico se acentúa en las regiones del noroeste de Castilla y León y en las zonas montañosas. La mayoría de los suelos agrícolas de Castilla y León se asientan sobre depósitos sedimentarios de la era terciaria, en especial en el centro de la meseta.

Estas condiciones físicas de Castilla y León determinan que la producción agraria de la región coincida con las grandes producciones europeas de cereales, carne de bovino, leche y azúcar (Miranda & Rico, 2007), objeto de procesos de reforma de la Política Agraria Común (PAC) de la Unión Europea.

La población de Castilla y León es de 2563521 habitantes (INE, 2010), con lo que su densidad de población es de 27,21 habitantes por km², aproximadamente un tercio de la de España, que es de 92,61 habitantes por km². Se considera que es necesaria una población superior a 20 habitantes por km² para mantener el tejido económico y social de las zonas rurales (Miranda & Rico, 2007), y el 62% de los municipios de Castilla y León tienen una densidad de población inferior a 10 habitantes por km².

La importancia del sector agrario de Castilla y León en la economía regional es mayor que la del sector a nivel nacional, con una aportación en 2005 del 5,8% del Valor Añadido Bruto a precios de mercado de la región, frente al 3,8% en España. El empleo en este sector respresenta el 8,5% del empleo de Castilla y León frente al 5,3% a nivel de España (Miranda & Rico, 2007).

La industria agroalimentaria se propone como un pilar fundamental de la transformación del medio rural de Castilla y León. Las materias primas de calidad, el control al que se someten por parte de las autoridades sanitarias y la relación entre los usos agrícolas tradicionales y la industria agroalimentaria hacen que sea ésta una posibilidad de futuro para el medio rural. Desde 2000 a 2007 los productos agroalimentarios reconocidos bajo alguna de las figuras de calidad alimentaria oficiales se han duplicado en Castilla y León, sin incluir la producción integrada, ecológica o artesanal (ITACYL, 2010).

1.2.2. Las leguminosas en la agricultura de Castilla y León

Los cultivos herbáceos principales en la agricultura de Castilla y León son los cereales, las leguminosas de grano, los cultivos industriales, la patata, los cultivos forrajeros y las hortalizas. En superficie, en 2009 se dedicaron a cereales casi 2000000 ha, seguido en superficie por los cultivos industriales, que cubrieron 300000 ha. En tercer lugar se situaron las leguminosas para grano, con 140000 ha, seguidas de los cultivos forrajeros, con 120000 ha y la patata, con 23000 ha. Las hortalizas fueron los cultivos con menor número de hectáreas cultivadas (Consejería de Agricultura y Ganadería, 2009).

Las leguminosas en Castilla y León se cultivan con cuatro usos diferentes, como leguminosas para grano, cultivos forrajeros, cultivos industriales y cultivos hortícolas (Consejería de Agricultura y Ganadería, 2009).

La superficie dedicada a leguminosas grano en 2009 fue de 142005 ha, seguida de la dedicada a cultivos forrajeros, que superó las 110638 ha, y a hortalizas, que fue de 1720 ha. Por último la superficie de cultivos industriales de la familia de las leguminosas fue de 112 ha, siendo en su totalidad dedicadas al cultivo de la soja (*Glycine max* L. Merr).

Las leguminosas cultivadas como hortalizas fueron en su mayoría guisantes verdes (*Pisum sativum* L.), y en segundo lugar las habas (*Vicia faba* L.) y las judías verdes (*Phaseolus vulgaris*).

Las leguminosas forrajeras supusieron en 2009 más del 90% del total de cultivos forrajeros en Castilla y León, siendo la alfalfa (*Medicago sativa* L.) la leguminosa forrajera predominante, seguida de la veza (*Vicia sativa* L.).

Las especies cultivadas como leguminosas de grano fueron, en orden descendente de superficie en 2009, el guisante seco (*Pisum sativum*), la veza (*Vicia sativa* L., *Vicia villosa* Roth), el yero (*Vicia ervilia* L.), el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), la lenteja (*Lens culinaris* Medik), el altramuz (*Lupinus albus* L.), la judía seca (*Phaseolus vulgaris*) y el haba seca (*Vicia faba*). De ellas, las destinadas a la alimentación humana no supusieron ni siquiera el 10% de toda la superficie cultivada de leguminosas de grano.

La judía seca o alubia llegó a ocupar unas 2900 ha en Castilla y León en 2009, de las cuales más de 2200 ha se cultivaron en la provincia de León. La producción de esta provincia fue de 5900 toneladas, suponiendo la mayor parte de lo producido en Castilla y León, que fue de 6800 toneladas. La judía fue cultivada mayoritariamente en regadío, mientras que las demás leguminosas grano fueron cultivadas en su mayoría en terrenos de secano, con rendimientos menores.

La alfalfa y otras leguminosas forrajeras también se cultivaron en su mayoría en secano, pero el balance con el regadío fue más equilibrado que en los cultivos para grano.

Como cultivos forrajeros o industriales, la producción es competitiva, haciendo que pueda ser interesante el cultivo con insumos elevados y alta mecanización, como es el caso de la soja y de la alfalfa, mientras que existe la aptitud de las leguminosas como cultivos complementarios incluidos en las rotaciones, con una baja utilización de insumos y con productividad y competitividad económica bajas. En esta modalidad de cultivo se incluyen la mayoría de las leguminosas de grano. De hecho, en muchos casos estos cultivos han sido incluidos durante décadas en las rotaciones, de forma que se han establecido como cultivos tradicionales asociados a determinadas demarcaciones geográficas. Esto ha supuesto en algunos casos la obtención de marcas oficiales de calidad, como la Indicación Geográfica Protegida de la Judía de El Barco de Ávila, en Ávila, de la Lenteja de La Armuña en Salamanca o del Garbanzo de Fuentesauco en Zamora.

Sin embargo, la soja como leguminosa de grano recientemente ha comenzado a integrarse en las rotaciones de cultivos en regadíos del interior de España, también en Castilla y León. La soja no transgénica (la única permitida para su cultivo en España) es destinada mayoritariamente a la alimentación humana. La superficie cultivada en Castilla y León es variable, dependiendo de la disponibilidad de semillas y contratos en otras comunidades autónomas, donde la siembra se realiza antes. A nivel nacional, la superficie dedicada a la soja oscila alrededor de las 1000 ha, de las que 125 ha previsiblemente estarán en Castilla y León en 2010. En cambio, en el año 2006 se llegaron a cultivar 800 ha en Castilla y León. Extremadura y Andalucía son las regiones con mayor superficie de este cultivo. El rendimiento medio llega a superar los 4000 kg ha⁻¹ y la producción se realiza bajo un contrato de compra que asegura la producción al agricultor. A partir de 2007 se comenzó a practicar la inoculación y hay referencias de nodulación en el 90% de los suelos, con un aumento del contenido proteico desde el 34% al 40% entre el 2006 y 2009 (Jesús Hernández Díez, comunicación personal).

1.2.3. La alubia en el noroeste de Castilla y León

La región noroeste de la Meseta corresponde con la zona occidental de la Meseta en la provincia de León y la zona septentrional de Zamora, estando delimitada por la Cordillera Cantábrica y los Montes de León al norte y oeste y por los ríos Esla y Tera al este y sur, pertenecientes a la cuenca del río Duero. Los municipios de mayor población dentro de estos límites son, por orden demográfico, León, Benavente, Astorga, La Bañeza y Santa María del Páramo. Esta demarcación geográfica no existe administrativamente, pero constituye una unidad territorial que comparte una serie de características en relación a los usos agrícolas, vinculada con características del medio físico.

El clima mediterráneo continentalizado que caracteriza toda la Meseta presenta algunas peculiaridades en el noroeste, por la influencia atlántica, debido a la proximidad con regiones donde el clima húmedo atlántico es el predominante, o el prolongado período invernal, que se ve reforzado por la altitud media de la zona (entre 700 y 850 msnm).



Figura 5. Cultivo de la alubia en el noroeste de Castilla y León (localidad de Sueros de Cepeda, 2009)

Esta región es una zona de cultivo tradicional de la alubia (figura 5), de forma que la primera vez que aparecieron reflejos escritos sobre este cultivo en León lo sitúan en Priaranza de la Valduerna y Tabuyo del Monte, según el Catastro Comprobaciones de 1761 (Rubio Pérez, 1987). A mediados del siglo XX se ampliaron las zonas regables con las construcciones de los embalses de Barrios de Luna, del Porma y de Riaño, por lo que El Páramo tuvo una gran expansión, lo que se reflejó en un aumento de las superficies dedicadas a alubia en la comarca, que llegaban a 20000 ha en la segunda mitad del siglo XX, la mitad de ellas en El Páramo (Reinoso Sánchez *et al.*, 2007). A partir de entonces, y con la misma problemática del cultivo a nivel nacional, se redujeron las superficies a nivel provincial progresivamente hasta bajar de las 5000 ha en la provincia de León entre 2005 y 2008.

No obstante, el cultivo de alubia en el Noroeste de Castilla y León ha evolucionado de forma diferente al resto de España, y pese a que a finales del siglo XX el cultivo entró en regresión, en la década de los 2000 la superficie cultivada ha registrado el final de la caída. La tradición del cultivo y la diferenciación a nivel de variedades de alubias cultivadas han sido fundamentales para la consecución de la marca de calidad Indicación Geográfica Protegida

"Alubia de La Bañeza-León" (IGP) y ha contribuido a la ralentización en el descenso de la superficie cultivada en dicha IGP. La IGP fue reconocida en 2005, mediante la aplicación del Reglamento (España, 2006) por parte del Consejo Regulador.

En 2005 la superficie dedicada a alubia para ser comercializada a través de la IGP fue de 64 ha, y en 2009 fue de 145 ha, y en 2010 se espera que la superficie cultivada llegue a 200 ha. En los años previos la superficie mostró incrementos constantes, con excepción de 2008 donde hubo una ligera reducción (Mario Cordero Alija, comunicación personal). Las variedades de alubia incluidas en la IGP son "Riñón", "Canela", "Pinta" y "Plancheta" (figura 6). En 2009 la variedad "Riñón" supuso casi el 60% de la superficie total de la IGP, aunque años previos su cultivo ocupaba hasta el 70%. Las variedades "Pinta" y "Plancheta" se cultivaron en superficies similares, alrededor del 15% del total cada una, y la "Canela" apenas llegó al 8% de la superficie cultivada, por presentar rendimientos menores.

Estas variedades locales son, además, de especial interés para el mantenimiento de recursos fitogenéticos, por la calidad del producto junto con la adaptación a las condiciones ambientales locales (Casquero *et al.*, 2006). Además, se ha realizado una caracterización del germoplasma existente y una selección genealógica adecuando las cualidades de grano a la demanda del mercado (Casquero *et al.*, 2006, Ron *et al.*, 2004).

Los rendimientos de las alubias amparadas por la I.G.P. están alrededor de los 2000 kg ha⁻¹, con oscilaciones entre campañas debido a las condiciones climatológicas así como a las reservas hídricas para los regadíos (Mario Cordero Alija, comunicación personal).



Figura 6. "Alubia de La Bañeza - León". Variedades de alubia, de arriba a abajo, y de izquierda a derecha: "Pinta", "Riñón", "Canela" y "Plancheta" (fotografía Diputación de León)

1.3. Los rizobios

1.3.1. Origen del estudio y taxonomía de los rizobios

Desde hace más de un siglo se conoce la simbiosis entre unas bacterias del suelo y plantas leguminosas. El término rizobio se emplea para denominar a las bacterias que se encuentran en el suelo y tienen la capacidad de infectar raíces de plantas leguminosas e inducir la formación de nódulos. Este grupo de bacterias Gram-negativas se engloban en diferentes familias dentro de las α -Proteobacteria (phylum *Proteobacteria*, dominio *Bacteria*).

Los nódulos que aparecen en las raíces de las leguminosas en presencia de rizobios son unos órganos especializados de los tejidos radiculares de la planta para albergar a las bacterias fijadoras de N_2 (Taiz & Zeiger, 2006).

Inicialmente, los microorganismos capaces de nodular leguminosas se denominaron *Bacillus radicicola* (Beijerinck, 1888), y más tarde se pasó a hablar de *Rhizobium* con una sola especie *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

Con el paso del tiempo se fueron definiendo nuevas especies de rizobios al principio basándose principalmente en criterios de infectividad y fenotípicos y a partir de la década de los 80 del siglo pasado en criterios moleculares, especialmente en la secuenciación de genes, principalmente del gen ribosómico 16S. A partir de este momento se describieron además nuevos géneros que se distribuyeron en diferentes familias descritas a partir del año 2000 (tabla 2).

Recientemente se ha demostrado que la capacidad para inducir la formación de nódulos va más allá de las bacterias incluidas en el orden *Hyphomicrobiales*, ya que se ha descubierto la nodulación de algunas leguminosas por miembros de las β -Proteobacteria.

Igualmente hay algunas especies de plantas no leguminosas con capacidad para establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, como ocurre con el género *Parasponia*.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los rizobios (#: no rizobios con capacidad de nodular en simbiosis con leguminosas; *: especies sin capacidad de nodulación descrita en los rizobios) (Rivas et al., 2009)

α-Proteobacteria - Orden <i>Hyphomicrobiales</i>			
FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	PLANTA HOSPEDADORA
Rhizobiaceae	Rhizobium	<i>R. alamii</i>	*
		<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana</i>
		<i>R. cellulosilyticum</i>	*
		<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. fabae</i>	<i>Vicia</i>
		<i>R. galegae</i>	<i>Galegae</i>
		<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i>
		<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania</i>
		<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>
		<i>R. larrymooreii</i>	*
		<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum</i>
		<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. mesosinicum</i>	Leguminosas chinas
		<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
		<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. multihospitium</i>	Leguminosas chinas
		<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza</i>
		<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. pisi</i>	<i>Pisum</i>
		<i>R. radiobacter</i>	*
		<i>R. rhizogenes</i>	*
		<i>R. rubi</i>	*
		<i>R. selenitireducens</i>	*
		<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
		<i>R. tibeticum</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. undicola</i>	*
		<i>R. vitis</i>	*
		<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
		Ensifer (Sinorhizobium)	
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia</i>		
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine</i>		
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia</i>		
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia</i>		
<i>E. melloti</i>	<i>Medicago</i>		
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago</i>		
<i>E. morelense</i>	*		
<i>E. saheli</i>	<i>Acacia</i>		
<i>E. terangae</i>	<i>Acacia</i>		
<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine</i>		
<i>E. adhaerens</i>	*		

Tabla 2. CONTINUACIÓN

α-Proteobacteria - Orden Hyphomicrobiales			
FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	PLANTA HOSPEDADORA
Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia</i>
		<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha</i>
		<i>M. australianum</i>	<i>Biserrula</i>
		<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana</i>
		<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis</i>
		<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer</i>
		<i>M. gobiense</i>	Leguminosas chinas
		<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>
		<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer</i>
		<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis</i>
		<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula</i>
		<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia</i>
		<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana</i>
		<i>M. tarimense</i>	Leguminosas chinas
		<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus</i>
<i>M. thiogangeticum</i>	*		
<i>M. tianshanense</i>	<i>Sophora</i>		
Phyllobacterium	Phyllobacterium	<i>P. trifolii</i> #	<i>Trifolium</i>
			*
Nitrobacteriaceae	Bradyrhizobium	<i>B. betae</i>	
		<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i>
		<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i>
		<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
		<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus</i>
		<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i>
		<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus</i>
		<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
Blastobacter	Blastobacter	<i>B. denitrificans</i> #	<i>Aeschynomene</i>
Hyphomicrobiaceae	Azorhizobium	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
		<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania</i>
Devosia	Devosia	<i>D. neptuniae</i> #	<i>Neptunia</i>
Brucellaceae	Ochrobactrum	<i>O. lupini</i> #	<i>Lupinus</i>
		<i>O. cytisi</i> #	<i>Cytisus</i>
Methylobacteriaceae	Methylobacterium	<i>M. nodulans</i> #	<i>Crotalaria</i>
β-Proteobacteria - Orden Burkholderiales			
Burkholderiaceae	Burkholderia	<i>B. cepacia</i>	<i>Dalbergia</i>
		<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i>
		<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa</i>
		<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium</i>
		<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa</i>
		<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus</i>
		<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>

Como se puede observar en la tabla 2, actualmente existen varias especies filogenéticamente relacionadas con los rizobios que no nodulan leguminosas, entre ellas cabe destacar al género *Agrobacterium*, reclasificado en el género *Rhizobium* por Young *et al.* (2001). Pero esta propuesta no ha sido aceptada por todos los investigadores y Farrand *et al.* (2003), con el apoyo de investigadores de distintos países, propusieron mantener el género *Agrobacterium* y rechazaron su inclusión en *Rhizobium*. El argumento para mantener en géneros diferentes las especies de *Agrobacterium* y *Rhizobium* se basó en primer lugar en la naturaleza polifilética de ambos géneros de acuerdo con las evidencias encontradas al analizar las secuencias del gen ribosómico 16S.

1.3.2. Los rizobios que nodulan *Phaseolus*

Phaseolus es capaz de establecer relaciones simbióticas efectivas con varios géneros y especies de rizobios, por lo que se considera una de las leguminosas con mayor grado de promiscuidad. Además, la planta es capaz de percibir las señales de nodulación de especies con las que no es posible establecer una simbiosis efectiva (Michiels *et al.*, 1998). Las especies de rizobios que establecen simbiosis efectiva con la alubia hasta el momento son *Rhizobium lusitanum* (Valverde *et al.*, 2006), *R. giardinii* y *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. mongolense* (van Berkum *et al.*, 1998), *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991), *R. rhizogenes* (Velázquez *et al.*, 2005), *R. leguminosarum* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000, Velázquez *et al.*, 2001a), *R. phaseoli* (Ramírez Bahena *et al.*, 2008), *Rhizobium tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991), *Sinorhizobium fredii* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000, Velázquez *et al.*, 2001a; Mahndi *et al.*, 2006), *S. meliloti* así como especies de *Bradyrhizobium* (Parker, 2002; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2006).

Las cepas de rizobios procedentes de América parecen haberse diseminado en otros continentes. La cepa predominante del centro de diversificación de alubia mesoamericano es *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993; van Berkum *et al.*, 1996; Caballero-Mellado & Martínez-Romero, 1999), aunque también ha aparecido en nódulos de plantas silvestres de *Phaseolus* encontrados en Argentina (Aguilar *et al.*, 1998). En un principio, sólo se suponía *R. leguminosarum* como microsimbionte en Europa, probablemente debido a la transferencia del plásmido de simbiosis desde *R. etli* a *R. leguminosarum* (Segovia *et al.*, 1993, García Fraile *et al.*, 2010). Sin embargo, en Francia, España y Austria se han encontrado otras especies como *R. gallicum* o *R. giardinii* (Amarguer *et al.*, 1997, Herrera-Cervera *et al.*, 1999; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000), aunque también se ha propuesto el origen americano de *R. gallicum* que se ha encontrado en México (Silva *et al.*, 2003). Por el contrario también *R. leguminosarum* se ha encontrado en Brasil (Mostasso *et al.*, 2002).

1.3.3. Establecimiento de la relación simbiótica entre la leguminosa y el rizobio

La simbiosis entre plantas y bacterias con capacidad de fijación de nitrógeno comienza con la percepción de la presencia entre ellas en la rizosfera. El establecimiento de la simbiosis es un proceso específico, lo que implica que no todas las bacterias capaces de inducir nodulación de plantas lo hará con todas las plantas con capacidad de nodulación, sino que se han desarrollado especificidades en la interacción, de modo que cada especie vegetal sólo nodula con unas determinadas especies bacterianas. Además, la base genética del establecimiento de la simbiosis en la bacteria se encuentra en el plásmido *pSym*, lo que

implica que su pérdida supone la inoperancia del rizobio como nodulador y fijador de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2003).

Sustancias de naturaleza flavonoide exudadas por la raíz vegetal como metabolitos secundarios son las responsables de la iniciación del proceso, al ser reconocidas por las bacterias de la rizosfera, entre las que se encuentran en forma saprofítica los rizobios (Stacey, 2007). Estas sustancias activan la transcripción de los genes *nod* del rizobio, que codifica para una proteína (lipo-quitina modificada) llamada señal Nod. Ésta es reconocida por la planta y sirve como señal activadora del proceso de transcripción de genes responsables de la formación del primordio nodular en los pelos radiculares. La capacidad para inducir nodulación en la raíz de la planta viene determinada por la presencia de genes *nod* en la bacteria, y parece ser que sólo en los rizobios existe esta capacidad entre todos los procariotas.

La entrada de la célula bacteriana a través de pelos radicales parece estar mediada por la secreción de celulasas por parte de la bacteria capaces de degradar la pared celular del pelo la planta (Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008). La figura 7 muestra el proceso de la formación del nódulo. Posteriormente la bacteria entra en un proceso similar al de endocitosis, donde una membrana rodea la bacteria a modo de orgánulo. Dentro del simbiosoma la bacteria sufre ciertos cambios en su sistema enzimático y en su morfología, que hace que se denomine bacteroide en el interior de la raíz.

Se han descrito dos tipos morfológicos de nódulo, el tipo determinado y el indeterminado (Stacey, 2007; Sprent, 2005). El primero, que se forma en plantas como soja o alubia, se inicia con sucesivas divisiones de las células del córtex radicular formando una estructura de nódulo globular con tejido periférico vascular. Los nódulos indeterminados son más alargados, debido a que crecen en longitud desde un meristemo apical. (figura 8)

En el interior del nódulo existe una baja concentración de oxígeno (O_2), debido a la barrera física que supone su morfología y a la presencia de la leghemoglobina, proteína sintetizada por la planta y que captura el oxígeno molecular.

Esta baja concentración de O_2 es esencial porque la nitrogenasa responsable de la fijación de N_2 (figura 9) se inhibe en su presencia. Esta enzima se localiza en el citoplasma del bacteroide, y no es transportada hacia las células vegetales (Madigan *et al.*, 2003). El requerimiento de bajos niveles de oxígeno para un correcto funcionamiento contrasta con el hecho de que los rizobios sean microorganismos aeróbicos, con lo que se ha desarrollado un sistema de respiración que usa el oxígeno como aceptor final de electrones sin que esté presente, gracias a que lo aporta la leghemoglobina.

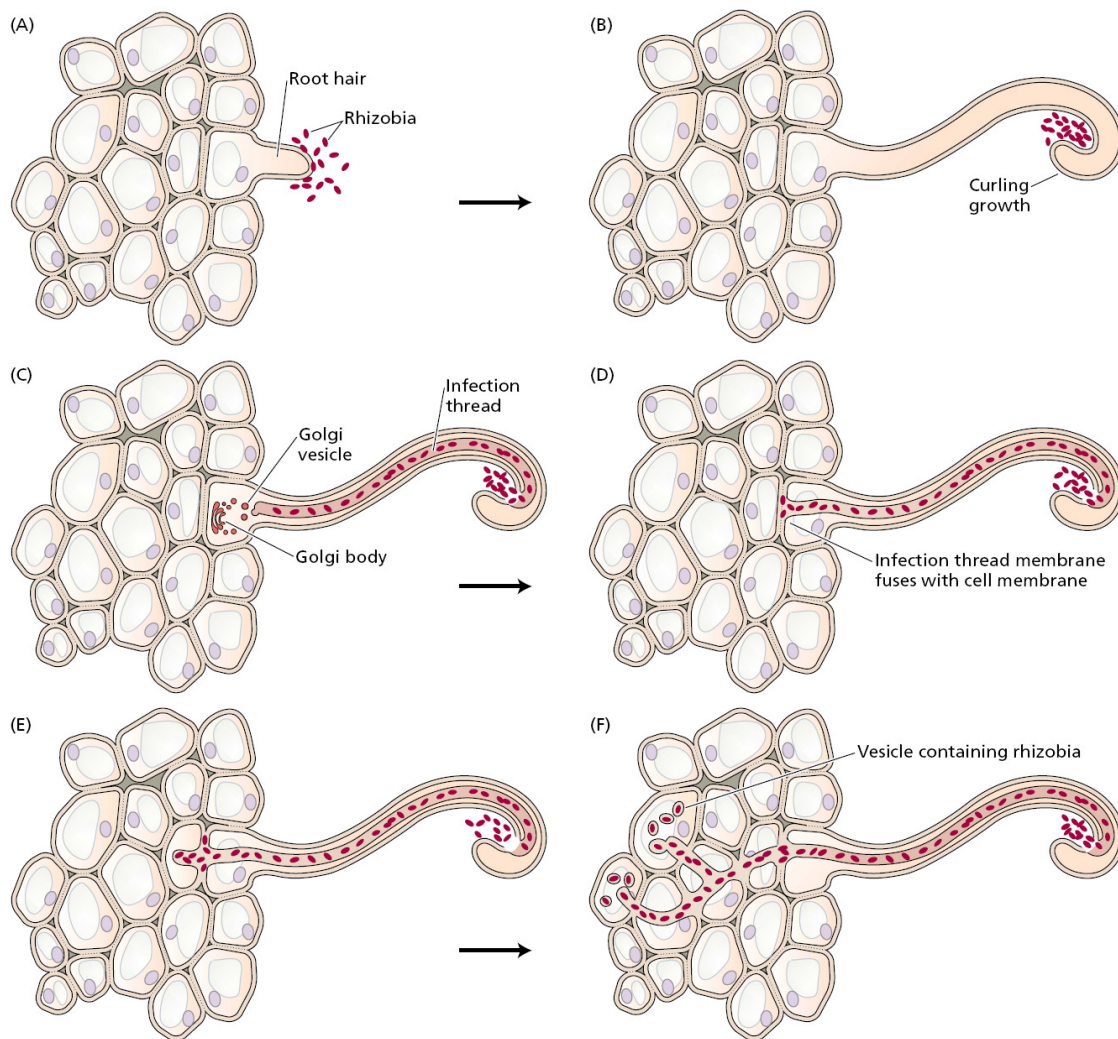


Figura 7. Inicio de la nodulación: (A) contacto del rizobio con la superficie del pelo radicular (B) curvatura anormal como resultado de las proteínas de nodulación Nod producidas por el rizobio; (C) degradación localizada del pelo radicular para la entrada del rizobio por el canal de infección a partir de las vesículas secretoras de Golgi de la célula vegetal; (D) fusión de la membrana del canal de infección con la membrana plasmática; (E) liberación de los rizobios en el apoplasto y formación de un nuevo canal de infección; (F) extensión del canal de infección hacia las células vegetales de la raíz y liberación en el citosol de las bacterias en los simbiosomas (Taiz & Zeiger, 2006).

La clave del inicio de la transcripción de los genes de fijación de N_2 (*fix* y *nif*) es el *nifA*, que codifica para la proteína NifA. La proteína FixL pertenece al sistema de regulación de la transcripción, que es dependiente de los niveles de O_2 (reguladores *FixL-FixJ*) y del potencial redox (*RegS-RegR*) (Stacey, 2007). La baja concentración de O_2 es la señal para que la quinasa FixL inicie la fosforilación de FixJ y active NifA, que regula la transcripción de los genes *nif* y *fix* (Prell & Poole, 2006).

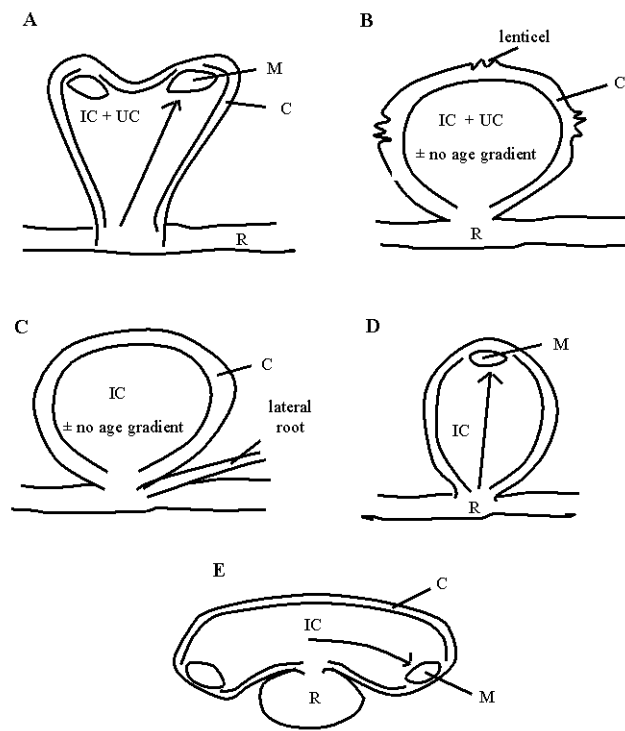


Figura 8. Tipos de Nódulo: (A) nódulo indeterminado, presente en las tres subfamilias, con uno o varios meristemos apicales (M meristemo, C córtex, IC tejido infectado, UC tejido no infectado, la flecha indica el gradiente decreciente de edad dentro del nódulo); (B) nódulo desmodioide (determinado); (C) nódulo aeschnomenoide (determinado); (D) nódulo indeterminado (Genisteeae); (E) nódulo lupinoide (Sprent, 2005)

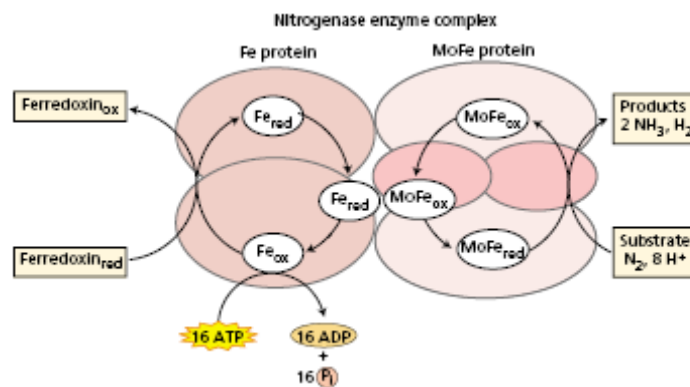


Figura 9. Funcionamiento del complejo de la nitrogenasa (Taiz & Zeiger, 2006)

1.3.4. Importancia de la biodiversidad y estudio de los rizobios

La agronomía está tomando conciencia de los posibles perjuicios de la pérdida de biodiversidad y la concentración de especies cultivadas a corto plazo. Se han perdido variedades locales adaptadas a un determinado ambiente por la reducción de la superficie dedicada a su cultivo hasta su desaparición, en favor de variedades exóticas más productivas, que pueden poseer mecanismos de defensa vulnerables fuera de su ambiente. Lo mismo puede ocurrir en las poblaciones microbianas del suelo, condicionadas por el conjunto de factores bióticos y abióticos.

Las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas forman parte de la comunidad microbiana del suelo. No obstante, su presencia en el suelo, su cantidad y su diversidad genética son muy variables, sin ser una garantía de una nodulación efectiva ni una eficiencia en la fijación de nitrógeno que mejore el estado nutricional de la planta (Grange *et al.*, 2007; Alberton *et al.*, 2006).

La incorporación de rizobios en lugares donde antes no existían ha mostrado resultados generalmente positivos (Thies *et al.*, 1991). Un ejemplo es el aumento notable del rendimiento del cultivo por la inoculación exitosa de la soja en América (Hungria & Vargas, 2000; Campo *et al.*, 2009), Australia (Fettell *et al.*, 1997; Howieson & Ballard, 2004) o Europa (Albareda *et al.*, 2008), todos ellos lugares lejanos al origen de la soja y carentes de rizobios nativos.

Sin embargo otros estudios han observado una nodulación baja y errática que hace que no sea interesante la práctica de la inoculación del cultivo. En especial esto ha ocurrido en alubia (Thies *et al.*, 1991; Graham, 1981; Buttery *et al.*, 1987). No obstante, también hay estudios que han demostrado la viabilidad del empleo de microorganismos como inoculantes cuando presentan capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de la zona donde se va a cultivar, en especial si el suelo carece de una población nativa de rizobios (Rodríguez Navarro *et al.*, 2000).

En menor medida se ha prestado atención a los estudios de nodulación y de eficiencia en los que se incluyen diferentes variedades de una misma leguminosa con el mismo rizobio. El caso de variedades ibéricas de *Phaseolus vulgaris* evaluadas cuando se les inoculó con la misma bacteria (Rodiño *et al.*, 2005) mostró que *Rhizobium tropici* CIAT899^T presentó una nodulación diferente y se reflejó en diferencias en el desarrollo vegetal entre variedades.

1.3.5. Estudios de biodiversidad y caracterización de rizobios

Existe una relación entre los términos clasificación, identificación y nomenclatura de bacterias. La clasificación es la ordenación de los microorganismos obtenidos dentro de grupos taxonómicos basada en cierta similitud. La identificación de los microorganismos conlleva el proceso de determinar a qué grupo taxonómico pertenece cada bacteria y la nomenclatura es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos de acuerdo con reglas aceptadas internacionalmente

Los estudios que analizan la biodiversidad o la caracterización de microorganismos beneficiosos para las plantas están generalmente basados en la electroforesis de ácidos nucleicos, principalmente del ADN (Peix *et al.*, 2007). También existen algunos estudios de biodiversidad y caracterización bacteriana basados en el ARN, de hecho el ARN de bajo peso molecular (LMW-RNA) es una herramienta para la agrupación de aislados (Velázquez

et al., 2001a). El empleo de técnicas basadas en la amplificación del ADN mediante la PCR (*polymerase chain reaction*) se ha generalizado, en gran parte por la facilidad de las técnicas y su economía. Entre las técnicas basadas en la PCR, la secuenciación de fragmentos de ADN de los microorganismos es apropiada para la identificación taxonómica, pero no tanto para los estudios de biodiversidad, ya que la secuenciación aún es una técnica compleja para un número elevado de aislados (Peix *et al.*, 2007). Sin embargo, para ello se han desarrollado técnicas que consiguen la agrupación por perfiles similares a nivel de género, especie o subespecie, tras la electroforesis del producto de la PCR. Las técnicas DGGE y TGGE (*denaturing y temperature gradient gel electrophoresis*) agrupan aislados cuyo ADN es variable en su contenido de guanina y citosina (G+C). Estas técnicas conllevan la desnaturalización del ADN mediante un agente desnaturalizante o alta temperatura, en función del contenido de G+C (la doble hélice de ADN está más fuertemente unida con mayor contenido de G+C ya que establecen tres puentes de hidrógeno en lugar de los dos que ocurren entre timina y adenina) (Muyzer, 1999). Otras técnicas aplican la electroforesis a productos de PCR de fragmentos amplificados al azar (RAPD, *random amplified polymorphisms DNA*) (di Cello *et al.*, 1997), fragmentos del ADN como el gen ribosómico 16S, como la técnica TP-RAPD (Rivas *et al.*, 2001) y otras amplificaciones que emplean uno o dos cebadores en la PCR para agrupar aislados a nivel intraespecífico (Box-PCR, ERIC-PCR, rep-PCR; Versalovic *et al.*, 1994; Hulton *et al.*, 1991). La aplicación de estas técnicas se basa en las condiciones de la PCR y en la secuencia de los cebadores iniciadores de la polimerasa.

Otros estudios de poblaciones microbianas realizan una digestión del producto de PCR con enzimas de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) y su posterior electroforesis, que es aplicable a eucariotas (Osborn *et al.*, 2000). La técnica ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) se ha mostrado útil para la clasificación de grupos de aislados a nivel de especie (Heyndrickx *et al.*, 1996). Otros estudios han reflejado la utilidad del ADN plasmídico (Hartmann & Amarger, 1991), proteínas (SDS-PAGE, Lowry *et al.*, 1951) o lipopolisacáridos (Tsay & Frasch, 1982), aunque están menos extendidos porque las técnicas basadas en el ADN se han extendido más los últimos años.

El Subcomité de taxonomía de *Rhizobium* y *Agrobacterium* (incluido en el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, ICSP) explica las consideraciones generales que hay que seguir para la descripción de rizobios, entre las que incluyen que hay que disponer de tres cepas al menos para la descripción de un nuevo taxón. En la descripción de nuevas especies es obligatoria la secuenciación del gen ribosómico 16S junto a otras técnicas basadas en la PCR como RAPD, RFLP, AFLP (*amplification fragment length polymorphisms*) o la secuenciación parcial del genoma bacteriano. El número de marcadores moleculares precisados para la descripción taxonómica de las cepas ha de ser adecuado para el nivel taxonómico que se busca. El subcomité propone igualmente el análisis de

varias secuencias de genes implicados en el metabolismo celular denominados *housekeeping*, lo que se conoce como MLST (*Multilocus sequence typing*).

En relación a los análisis de las características fenotípicas de los aislados, se considera importante desde el punto de vista del interés ecológico y evolutivo conocer el rango de leguminosas con capacidad para formar nódulos con el rizobio. También su crecimiento a distintas temperaturas, valores de pH, y su capacidad de crecimiento en medios con diferentes fuentes de C y de N. La resistencia a antibióticos es un estudio común en las descripciones de rizobios y en su caracterización. Cuando se trata es de describir una nueva especie, además se considera de gran interés la hibridación o reasociación ADN-ADN para estimar los valores de la complementariedad del genoma.

Los estudios que se han llevado a cabo para la caracterización de la biodiversidad de aislados de rizobios van en muchos casos paralelos a estudios de su infectividad y eficiencia de fijación de N en simbiosis con la planta hospedadora propia del aislado.

1.4. De la fijación biológica de nitrógeno al desarrollo de inoculantes microbianos

1.4.1. El ciclo del nitrógeno y la fijación de N_2 atmosférico

El nitrógeno es el cuarto elemento del grupo de los macronutrientes esenciales para los seres vivos, junto con el carbono, el hidrógeno y el oxígeno. Además, es el elemento limitante para el desarrollo vegetal en muchos casos cuando las plantas tienen cubiertas sus necesidades hídricas.

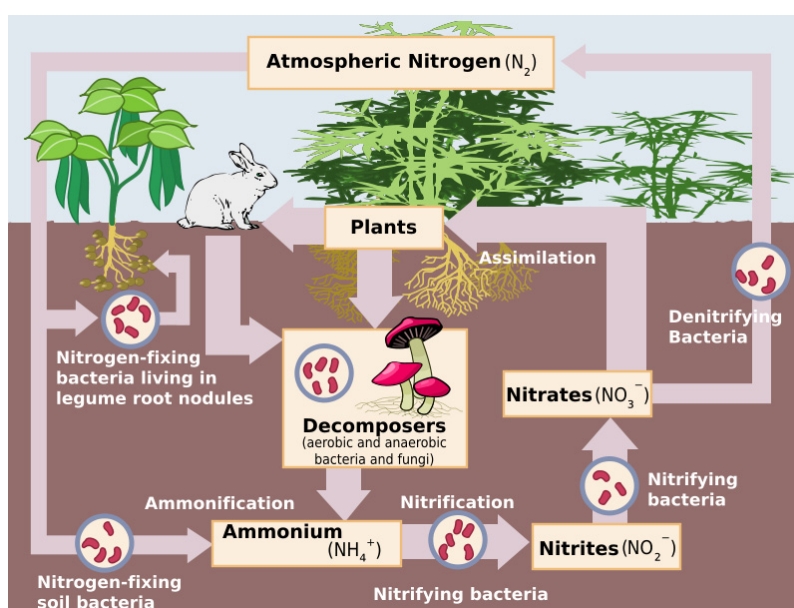


Figura 10. Ciclo biogeoquímico del N simplificado

La forma en la que los seres vivos adquieren el N y lo incorporan en sus moléculas es en forma de los iones nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Sin embargo, el mayor reservorio en la biosfera de nitrógeno está en la atmósfera en una forma inerte, N_2 , es decir, inaccesible. El ciclo biogeoquímico del N simplificado en el que no aparecen las acciones antropogénicas se ve reflejado en la figura 10.

La reserva de nitrato y amonio en el suelo proviene de la descomposición de materia orgánica y de la fijación natural de N_2 atmosférico cuando no se considera la acción humana. El N_2 fijado a partir de la atmósfera puede provenir de la fijación biológica (microorganismos con el complejo nitrogenasa) o fijación por descargas eléctricas.

La fijación antropogénica de N_2 atmosférico, no reflejada en el ciclo biogeoquímico observado, es un proceso que se desarrolló a principios del siglo XX, tras intentos fallidos de producir amonio a partir de nitrógeno atmosférico. El químico alemán Fritz Haber fue capaz de resolver los problemas técnicos relacionados con el proceso en 1909, pero el cambio de escala desde el laboratorio hasta un nivel industrial de producción de amonio lo consiguió junto con Carl Bosch, asignado por la empresa química BASF, que había adquirido previamente la explotación del proceso (Hager, 2008). El proceso de Haber-Bosch, que consigue amonio a partir del N_2 atmosférico, se lleva a cabo a temperaturas entre 350 y 500 °C, y presiones de hasta 25 MPa, con lo que el consumo de combustibles fósiles para conseguir estas condiciones es muy elevado.

El aumento de la demanda de fertilizantes nitrogenados es constante, en especial en los países emergentes (International Fertilizer Industry Association, 2010). Se estimó que la síntesis de fertilizantes nitrogenados supone entre el 1 y el 2% del consumo mundial de combustibles fósiles (Smil, 2001) y su contribución a las emisiones de CO_2 está en una proporción equivalente (220 10^6 toneladas de CO_2 emitidas anualmente).

En 1887, Hellriegel y Wilfarth observaron que la fijación de N_2 atmosférico estaba asociada con los nódulos de las raíces de las leguminosas, y un año después Beijerinck aisló y describió las bacterias de los nódulos radiculares (Fred *et al.*, 1932). Los microorganismos inicialmente fijadores de N fueron los encontrados en los nódulos, aunque luego se observó la presencia del complejo de la nitrogenasa en microorganismos de vida libre. Los microorganismos de fijación simbiótica son los rizobios, mientras que entre los de vida libre se encuentran cianobacterias, como *Anabaena* (Allen & Arnon, 1955; Cox *et al.*, 1964) y numerosos géneros de bacterias, entre las que destacan por su potencial como inoculantes *Azospirillum* (de Felipe, 2006) y *Beijerinckia* (Dobereiner, 1961).

El N_2 fijado biológicamente en el planeta es de aproximadamente 65 10^6 toneladas anuales, de las cuales la fijación por microorganismos en asociación simbiótica con leguminosas (30-300 kg N ha^{-1}) supone en torno a 40 10^6 toneladas anuales de N. En mucha menor medida

se encuentra el volumen de N fijado por asociaciones no simbióticas (0-50 kg N ha⁻¹) o microorganismos de vida libre (0-25 kg N ha⁻¹) (Peoples, 2008).

1.4.2. Evolución de la industria de los inoculantes

La inoculación de plantas se inició utilizando microorganismos fijadores de nitrógeno y la industria de producción de inoculantes ha estado siempre estrechamente ligada con la investigación en este campo.

Los agricultores conocían desde hace mucho tiempo que mezclar un suelo donde se había cultivado una leguminosa, transportando de modo inconsciente al microsimbionte, con otro en donde se pretendía cultivar la misma leguminosa mejoraba el rendimiento y esta práctica llegó a ser recomendada a los agricultores en los EE.UU. en el siglo XIX (Smith, 1992). Una década después fue patentado el primer inoculante comercial, "Nitragin" (Nobbe & Hiltner, 1896). La producción comercial de inoculantes de leguminosas comenzó en 1895 en los EE.UU. y en Reino Unido, y a finales del siglo XX se había extendido a todos los continentes (figura 11). La mayor parte de los inoculantes están formulados en polvo, con soportes orgánicos como la turba, que continúa siendo el soporte más común, generalmente esterilizada, generalmente con radiación gamma. (Roughley & Vincent, 1967).

Desde el inicio de su comercialización, los inoculantes se han extendido por el mundo, generalmente producidos por pequeñas empresas. El mayor desarrollo de los inoculantes comerciales ha ido ligado a la expansión del cultivo de la soja en América, y contribuciones menores se han encontrado en otras leguminosas en Australia, Europa, África, Asia o Nueva Zelanda. En los países en desarrollo, la baja calidad o sus limitaciones no ha permitido un éxito generalizado, por lo que su empleo ha sido más reducido (Bashan, 1998).

Aunque los primeros inoculantes se formularon con rizobios y estaban dirigidos a leguminosas, también los microorganismos no simbióticos han sido objeto de investigación, aunque hasta muy recientemente, todos ellos han resultado fallidos, como *Azotobacter*, que se utilizó en Rusia durante los años 30 y 40 del siglo XX, pero cuyo uso fue después abandonado por carecer de resultados positivos concluyentes (Rubenchik, 1963). También hubo un intento por emplear cepas de *Bacillus megaterium* solubilizadoras de fosfato en Europa oriental que acabó sin éxito (Macdonald, 1989). Sin embargo, en la actualidad existe en España un producto a base de *Azotobacter vinelandii*, bacteria de vida libre beneficiosa para las plantas (Registro de Otros Medios de Defensa Fitosanitaria, Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, 2010), lo mismo que ocurre con la aparición de *Azospirillum brasiliense* como inoculante para gramíneas en Brasil (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, 2009).

Uno de los problemas principales para la eficacia de los inoculantes son los soportes y a finales del siglo XX comenzó la búsqueda de nuevos soportes alternativos a la turba (Brockwell & Bottomley, 1995). Esa búsqueda continúa desarrollándose activamente, en especial en lugares donde la disponibilidad de turba es limitada, como en España (Albareda et al., 2008, Daza et al., 2000).

Los inoculantes generalmente se preparan por adición del caldo en el que ha crecido el microorganismo seguido por un período de incubación (Roughley & Pulsford, 1982), aunque autores como Somasegaran (1985) consideraron esta práctica innecesaria, ya que la población de rizobios continúa en crecimiento en la turba hasta 10^6 - 10^8 UFC mL⁻¹ durante siete días. Más recientemente, se está promoviendo la investigación con inoculantes líquidos, consiguiéndose poblaciones de $>10^9$ rizobios mL⁻¹. (Lie et al., 1992).

Los inoculantes se comercializan actualmente en los formatos en polvo, líquido y granular (figura 11). Apenas existen casos comercializados de inoculantes liofilizados. Entre las preparaciones granulares destaca la turba, aunque se están proponiendo y comercializando nuevos soportes, como arcillas u otros soportes minerales (Denton et al., 2009, Daza et al., 2000). Su aplicación se hace sobre el lecho de siembra o bien distribuidos superficialmente, en este caso se recomienda hacerlo pocas horas antes de la lluvia (Chris Poole, comunicación personal). Los inoculantes sólidos son generalmente empleados para la inoculación de la semilla y son aplicados directamente sobre ésta, con algún agente adhesivo, como sacarosa o goma arábica, que bien se recomienda añadir o viene incorporado en el inoculante. Los inoculantes líquidos pueden aplicarse a la semilla o hacerlo en el lecho de siembra justo antes de ésta (Stephens & Rask, 2000).

Existen inoculantes comerciales que contienen más de una cepa, aunque la tendencia actual es hacia el empleo de inoculantes de una cepa en países con buenos sistemas de control de calidad o en los que se recomienda una cepa determinada para cada ambiente o ecosistema, como Australia, Francia o Uruguay (Date, 2001). También se está llevando a cabo investigación para el empleo de una cepa de rizobio en un inoculante junto con otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). *Azospirillum* es un microorganismo diazotrófico con capacidad PGPR evaluada recientemente tanto por su actividad PGP por sí misma (Okon & Labandera, 2004) como en consorcio con *Rhizobium* (Dardanelli et al., 2008), y de esta forma las especies vegetales beneficiadas son de diferentes familias. También se ha visto el beneficio de la inoculación con *Bacillus* y *Paenibacillus* en arroz (*Oryza sativa* L.) (Beneduzi et al., 2008) y se está evaluando el crecimiento de caña (*Saccharum officinarum* L.) inoculada con *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (Passaglia, datos no publicados). En otros casos están apareciendo resultados favorables a la coinoculación de un rizobio con una PGPR, como es el caso de *Azospirillum* (por ejemplo

Groppa et al., 1998), *Bacillus* (por ejemplo Petersen *et al.*, 1996) y otros géneros bacterianos (por ejemplo Xavier & Germida, 2002).



Figura 11. Inoculantes comerciales. (A) inoculante comercial sólido sobre turba; (B) semillas de guisante con inoculante sólido basado en turba adherido; (C) raíz de soja con presencia de nódulos en un campo de soja inoculado en Joao Pinheiro (Brasil).

En la actualidad, el mercado de los inoculantes en los países desarrollados está cubierto en gran medida por empresas de gran tamaño con base en Norteamérica, como eran Philom Bios, Becker Underwood, Nitragin y Agribiotics en 2004. En 2010 hay una reorganización de algunas de estas empresas, de forma que sólo Becker Underwood se mantuvo independiente, mientras que Philom Bios fue comprada por la danesa Novozimes (CanWest MediaWorks Publications, 2007), mientras que Nitragin, que era una filial americana del grupo alemán Merck compró Agribiotics en 2006 transformándose después en EMD Crop BioScience (Merck, 2006a, b). Esto da una idea de la concentración del mercado en manos de pocas empresas de gran porte.

El consumo de inoculantes a nivel mundial se distribuye principalmente en América, con un 35% del consumo mundial, Europa con un 3%, y un 62% en el resto, atribuible en gran medida a un consumo no comercial en Asia (Philips, 2004).

El beneficio bruto de la inoculación en los países desarrollados para el fabricante está en torno a 4,65 dólares por hectárea, como resultado la facturación mundial se estimó en 75 10⁶ dólares, considerando el mercado asiático muy poco influyente en el total ya que muchos fabricantes son empresas públicas y la calidad de los productos no es elevada (Philips, 2004).

1.4.3. Marco legal de los inoculantes en España y en el mundo

El control de calidad y la regulación de los inoculantes varían entre países. De esta forma, en los EE.UU. o en el Reino Unido este control lo ejerce el fabricante, en otros países se lleva a cabo mediante una organización a la que se adhieren voluntariamente los fabricantes, como Sudáfrica o Australia, o está regulado mediante una institución gubernamental, como en Uruguay o Brasil. Sin embargo, la legislación desfavorable para las patentes de Latinoamérica, por ejemplo la de Brasil o la de México, tiene como consecuencia una inversión privada reducida en investigación y desarrollo de nuevos productos, con lo que la financiación de la investigación está en el sector público (Hungria *et al.*, 2005).

También existen diferencias nacionales en la política de recomendación de cepas para la inoculación. En los EE.UU. cada compañía determina las cepas que empleará en sus productos, mientras que en Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) los inoculantes deben contener las cepas recomendadas por organismos públicos competentes en esa materia.

El mercado global de los inoculantes se puede dividir en dos sectores (Phillips, 2004). En primer lugar está el sector comercial desarrollado de América, Europa y Australia, dominado por pocos fabricantes, con gran calidad de los inoculantes, que responden a los controles de calidad legislativos o no legislativos de estos países, con gran competencia que presiona a los fabricantes hacia la mejora de la calidad y competitividad (Bullard *et al.*, 2005; Catroux *et al.*, 2001; Lupwayi *et al.*, 2000). En contraste, el sector de los inoculantes para leguminosas en Asia y Africa es menos sofisticado y más fragmentado, con elevada variabilidad en calidad en los inoculantes y más fabricantes (Lupwayi *et al.*, 2000).

Los retos de los mercados desarrollados de inoculantes son el desarrollo de nuevas tecnologías y productos a nivel de la industria y refinar las prácticas de inoculación a nivel del agricultor, mientras que para el mercado afroasiático los retos están basados en la calidad y en la distribución, extendiendo más su empleo. Por ejemplo, Vietnam produce anualmente alrededor de 700000 ha de leguminosas sin inoculación y a las que se les añaden 50-150 kg N ha⁻¹ en forma de fertilizantes (Herridge, 2005).

En España y en Portugal no existen plantas fabricantes de inoculantes a nivel industrial, y hasta los años 90 del siglo XX se venían elaborando lotes reducidos para cubrir una demanda muy baja en el Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (Oeiras, Portugal) y en el Centro IFAPA Las Torres-Tomejil (Alcalá del Río, España) (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2009).

La legislación española no establece listas de microorganismos admitidos para su empleo como inoculantes ni define el control de calidad de los inoculantes comercializados en España. El Real Decreto 824/2005 (España, 2005) sobre productos fertilizantes desarrolla directivas europeas y amplía la legislación nacional sobre estos productos, sin mencionar el término microorganismo en ningún apartado, al igual que sus modificaciones posteriores con el Real Decreto 1769/2007 (España, 2008a) ni con la Orden APA/863/2008 (España, 2008b).

La Ley 43/2002 de sanidad vegetal (España, 2002) tampoco recoge el empleo de microorganismos como inoculantes, aunque en este caso ampara el empleo de microorganismos considerándolos sustancias activas (las sustancias o microorganismos, incluidos los virus, que ejerzan una acción general o específica contra las plagas o en vegetales, partes de vegetales o productos vegetales) para el control biológico.

No obstante, la Directiva 1991/414/CEE del Consejo (Consejo de las Comunidades Europeas, 1991) que regulaba la comercialización de productos fitosanitarios fue modificada posteriormente por la Directiva 2001/36/CE de la Comisión (Comisión de las Comunidades Europeas, 2001) incluyendo nuevos apartados en los que se regulan los productos fitosanitarios cuya sustancia activa sea a base de microorganismos, por tanto sólo esta directiva recoge la regulación de los productos fitosanitarios a base de microorganismos, principalmente orientando los requisitos legislados en materia de sanidad. La Directiva 2009/128/CE (Parlamento Europeo y Consejo, 2009) establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, sin que mencione tampoco ningún aspecto relacionado con microorganismos.

En España, el Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino de España (MARM) mantiene el Registro de Productos Fitosanitarios (Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, 2010a) y existe una serie de sustancias activas reconocidas y registradas como fitosanitarios (Sustancias activas de Productos Fitosanitarios) aceptadas, excluidas y en revisión comunitaria a 22 de marzo de 2010. En estas listas aparecen microorganismos reconocidos como bioinsecticidas o fungicidas, como *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* o *Streptomyces*, así como una lista de sustancias activas en fase de evaluación, entre las que aparecen también *Pseudomonas* sp. y *Trichoderma* sp. con acción fungicida. También el MARM presenta el registro de OCB (organismos de control biológico, que sólo contempla macroorganismos) y OMDF (otros medios de defensa fitosanitaria), que

contempla bacterias como *Azotobacter* y hongos micorrícicos (Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, 2010b; 2010c).

Por lo tanto, en la actualidad no existe un registro oficial donde aparezcan los inoculantes comercializados en España, aunque es posible que en 2011 exista una normativa que regule los productos que en la actualidad están apareciendo y difícilmente encajan en las clasificaciones establecidas por el MARM (Alejandro Martínez Peña, comunicación personal), como es el caso de *Azotobacter* fijadora de N en Otros Medios de Defensa Fitosanitaria.

1.4.4. Ejemplo de la investigación y desarrollo en inoculantes en Brasil

La soja (*Glycine max* L. Merr.) fue introducida en Brasil en 1882, pero el cultivo a gran escala no comenzó hasta los años 60 del siglo XX. Los suelos brasileños carecían de rizobios efectivos en la nodulación y fijación de N₂ con la soja y los inoculantes aparecieron en el mercado brasileño en esos mismos años, procedentes principalmente de los EE.UU..

La investigación orientada a la selección de cepas adaptadas a las condiciones locales y a la acidez de los suelos comenzó también en aquellos años con Döbereiner y colaboradores en 1970 entre otros y ha continuado hasta la actualidad. (Hungria & Vargas, 2000) con resultados satisfactorios. El rendimiento medio de la soja cultivada en Brasil pasó de 1166 a 2765 kg ha⁻¹ entre 1968 y 2003, lo que implica un aumento en la demanda de N por el cultivo, y por lo tanto, de nuevas cepas eficientes en la fijación de N₂ (Hungria *et al.*, 2005). Las cuatro cepas empleadas en los inoculantes actuales de soja en Brasil pueden aportar el requerido por la soja para obtener un rendimiento de 4000 kg ha⁻¹ (Hungria *et al.*, 2005).

La alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) es la segunda leguminosa en importancia en Brasil. Su rendimiento fue 728 kg ha⁻¹ en 2003, debido en gran parte al acceso limitado de los agricultores a la tecnología. Su falta de respuesta a la inoculación se atribuyó a la presencia de una gran población de rizobios inefectivos en el suelo (Graham, 1981), pero la temperatura y acidez del suelo también son determinantes en Brasil, por lo que en este cultivo la investigación en inoculantes busca la adaptación de las cepas a las condiciones ambientales locales. La mayoría de las cepas recomendadas pertenecen a la especie *Rhizobium tropici*, como *R. tropici* PRF81 (SEMIA4080), resistente a alta temperatura, que incrementó el rendimiento hasta 900 kg ha⁻¹. Los experimentos de campo en suelos con 10⁴-10⁵ rizobios por gramo (Hungria *et al.*, 2000) y su promoción ha incrementado la venta de inoculantes un 25% en tres años. Estas investigaciones continuaban en 2005 con otras cepas de *R. tropici* de los Cerrados en Brasil.

Las 11 fábricas de inoculantes en Brasil contaban en 2009 con 380 productos registrados, la mayoría para leguminosas grano y en menor medida para otras leguminosas y para

eucalipto, aunque el cultivo de soja es el más predominante en datos de producción y comercialización de inoculantes, y muy por detrás se encuentra la alubia (Villamil Bangel, 2009). El consumo de inoculantes va en continuo aumento, desde las 12 10^6 dosis en 1999 hasta las 18,7 10^6 dosis en 2008 (Associação Nacional de Produtores de Inoculantes, 2010). En la asociación de productores hay nueve empresas diferentes con la función de la divulgación de los resultados y estadísticas.

El marco legal de los inoculantes en Brasil está recogido en la legislación nacional, aunque entrará en vigor una única ley que sustituirá las anteriores, la Portaria 325 de 14 de septiembre de 2009, (República Federativa do Brasil, 2009). Esta ley recoge los parámetros mínimos de calidad de un inoculante comercial, su etiquetado y embalaje, el protocolo oficial de análisis de la viabilidad y eficiencia del inoculante y un listado con las especies de microorganismos susceptibles de ser empleadas en los inoculantes comerciales.

La legislación brasileña define al inoculante como cualquier producto que contiene microorganismos y que tiene una actuación favorable para el crecimiento de plantas. De esta forma establece una diferencia con los formulados para el control biológico de plagas y enfermedades y otros productos empleados en la agricultura basados en el uso de microorganismos. Los géneros bacterianos permitidos en la fabricación de inoculantes son *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Frauteria* y *Azospirillum*. Todos ellos están en colecciones oficiales en Brasil, de las que el Ministerio de Agricultura es responsable, y son recomendados para cultivos, en su mayoría leguminosas, pero también para trigo, maíz, arroz y eucalipto.

1.4.5. El laboreo de conservación y su relación con la fijación biológica de N₂

La agricultura de conservación engloba prácticas que permiten el manejo del suelo agrícola alterando al mínimo su composición, estructura y biodiversidad natural y evitando en lo posible procesos de erosión y compactación. Se estima que en Europa se dedican a estos laboreos 16 10^6 ha (European Conservation Agriculture Fundation, 2010), repartidas entre el mínimo laboreo (12 10^6 ha) y la siembra directa (3 10^6 ha). Un millón de hectáreas contribuyen a estos datos, principalmente en olivares y frutales.

España es el país que lidera la implantación del laboreo de conservación en Europa, según AEAC/SV (Asociación Española de Agricultura de Conservación/Suelos Vivos). Se practica en aproximadamente 650.000 ha, siendo los principales cultivos el trigo, la cebada y en mucha menor medida el maíz y el girasol, es decir, cultivos extensivos. Además, muchas plantaciones de olivos y frutales (893000 ha en 2006), en muchos casos con cobertura vegetal herbácea. Se estima que está llegando a suponer el 10% de la superficie agraria útil

española (Derpsch & Friedrich, 2009). No obstante, Europa es el continente con menor porcentaje de superficie agraria bajo estos tipos de laboreo, muy por detrás de países como Brasil o Paraguay, con cerca del 70% de su superficie bajo siembra directa.

Los laboreos de conservación consiguen una mejora en el contenido de materia orgánica del suelo y una reducción de las pérdidas de nutrientes del mismo por erosión, lo que se traduce en un efecto beneficioso para el mantenimiento de la estructura y propiedades del suelo. Sin embargo, la aplicación de enmiendas o inoculantes en superficie en sistemas de laboreo de conservación hace necesaria la difusión hacia capas profundas del suelo, que generalmente ocurre por lixiviación (Graham & Vance, 2000). Esto implica una ralentización en la distribución de inoculantes cuando su distribución es superficial.

En cuanto a la población microbiana en el suelo, Kaschuk *et al.* (2006) observaron que el suelo bajo laboreo convencional tiene nivel mayor de diversidad genética en rizobios de alubia frente a la siembra directa en Brasil, por lo que sugirieron se produce una reducción de la diversidad como consecuencia de la estabilidad del suelo sin laboreo, permitiendo el predominio de las más competitivas, aunque otros estudios demostraron un aumento de la biodiversidad microbiana. Un estudio de suelos en siembra directa durante 26 años llevado a cabo por Adl *et al.* (2006) concluyó que los primeros años el aumento de la biodiversidad es moderado, mientras que a largo plazo aumenta el número y diversidad de organismos en el suelo.

La mineralización y nitrificación en sistemas de siembra directa pueden provocar una inmovilización de N y una desnitrificación mayor. Esta inmovilización de N bajo laboreos de conservación conlleva un acúmulo de N en el suelo hasta llegar al equilibrio con la descomposición de la materia orgánica. Ese menor N disponible en el suelo provoca un aumento de la fijación de N₂ en soja, de forma que el N derivado de la fijación atmosférica aumentó desde menos del 75% hasta el 85% (Wheatley *et al.*, 1995). De igual modo, el N total fijado aumentó de 180 a 232 kg N ha⁻¹ en condiciones de siembra directa (Hughes & Herridge, 1989).

Sin embargo, otros autores no observaron mejoras en la fijación de N₂ en laboreos de conservación, como Dalal *et al.* (1997), que observaron un efecto nulo en el garbanzo bajo condiciones hídricas limitantes o contenido alto de nitratos en el suelo o López-Bellido *et al.* (2004), que no observaron un cambio en los patrones de fijación de N en el garbanzo en experimentos llevados a cabo en España bajo diferentes tipos de laboreo.

Numerosos estudios han concluido que el factor determinante que controla la fijación de N es el grado al cual la demanda de N es satisfecha por el N del suelo, y por lo tanto en esos términos es donde se puede enmarcar la influencia de los laboreos en la fijación simbiótica de N. En laboreos de conservación, la reducción del N disponible y la mayor humedad del suelo pueden incrementar la fijación biológica de N₂ (Kessel & Hartley, 2000).

Las cubiertas con restos vegetales que se mantienen en el laboreo de conservación conllevan generalmente un sombreado del suelo. También existen prácticas agrícolas en las que se incluyen coberturas del suelo con un cultivo auxiliar. Además de evitar erosión, reducir evapotranspiración y ayudar a tamponar la temperatura del suelo, existen residuos vegetales con efecto alelopático sobre las plantas adventicias, y de ahí que se sugiera la utilización de estas coberturas con el fin de controlar las poblaciones de plantas adventicias en el cultivo (Urbano *et al.*, 2006; Weston, 1990, 1996). La liberación de compuestos alelopáticos tiene efectos diversos en la población microbiana del suelo, de forma que se ha sugerido una mejora indirecta de la fijación biológica de N₂ en el suelo (Sturz & Chirstie, 2003), aunque otros estudios parecen mostrar un efecto perjudicial de éstos sobre la nodulación (Batish *et al.*, 2007). No obstante, en rotaciones, la incorporación del centeno como un cultivo de invierno para cobertura vegetal ha mostrado que no reduce el rendimiento de la soja y supone un almacenamiento del N del suelo en complejos orgánicos con una liberación más lenta, evitando la pérdida de los nitratos del agrosistema (Ruffo *et al.*, 2004). La diferente naturaleza de los compuestos alelopáticos puede ser decisiva para entender las diferentes conclusiones en estos resultados.

1.4.6. Tendencias en la investigación y el desarrollo de inoculantes

El Centro para los Estudios de *Rhizobium* (CRS, Perth, Australia) ha llevado a cabo durante años la selección de cepas orientadas al desarrollo de inoculantes en Australia, con un programa de selección de cepas descrito por Howieson *et al.* (2000) en cuatro fases:

- Fase 1 - colección de germoplasma de la población de rizobios del suelo y su mantenimiento como liófilos
- Fase 2 - experimentos en invernadero para validar la infectividad y eficiencia de fijación de N de los aislados
- Fase 3 - evaluación de las cepas de élite a partir de la fase 2 en experimentos de campo en 2-3 años, así como evaluación de su supervivencia en ausencia de la planta hospedadora
- Fase 4 - experimentos por entidades independientes en un amplio rango de ambientes para la confirmación de la fase 3

Este planteamiento sirvió al CRS para la selección de cepas efectivas para *Pisum*, *Lens*, *Vicia* y *Lathyrus*. Este programa busca las características más favorables para estos cultivos en las condiciones edafoclimáticas locales (figura 12).

Las propiedades no evaluadas de forma rutinaria en esta programación son la aptitud de las cepas para entrar en un proceso de fabricación automatizado, su estabilidad genética, vida útil del inoculante, supervivencia en la semilla y compatibilidad con productos fitosanitarios.

La experiencia australiana ha demostrado que prácticamente todas las cepas son aptas para su industrialización. La estabilidad genética es otro reto más complejo para la investigación en inoculantes. Al menos 19 cepas de inoculantes han variado desde que fueron identificadas o descritas en relación a sus características fenotípicas o simbióticas (McInnes *et al.*, 2005).



Figura 12. Experimentos de evaluación de inoculantes en guisante (A) y altramuza (B, C y D) en Australia

La supervivencia en la semilla tras la inoculación ha sido un importante objetivo de las investigaciones recientes, por la variación en las tasas de supervivencia (por ejemplo 1-89% en semilla con *Mesorhizobium loti*; Lowther & Patrick, 1995), ya que el establecimiento de las plantas y la nodulación es proporcional a la tasa de supervivencia del inoculante en la semilla.

La cuestión planteada por Herridge (2005), ¿qué se necesita para afrontar el futuro en el desarrollo de inoculantes?, tiene las siguientes posibles respuestas:

- Un programa nacional de desarrollo de inoculantes con financiación adecuada, potencialmente externa (FAO o Banco Mundial)
- Una persona o equipo investigador que lidere los programas de investigación y desarrollo, como ha ocurrido en Australia con J.M. Vincent, J. Brockwell, y R.J. Roughley, en Brasil con J. Döbereiner y J.R. Jardim Freire y en los EE.UU. con J. Burton.
- Entrenamiento en las técnicas de producción y control de calidad de inoculantes.
- Investigación y desarrollo en cepas para inoculación, soportes, métodos de producción y de aplicación de inoculantes.
- Programa amplio y duradero para la divulgación y demostración de resultados de la inoculación y sus efectos en la agricultura.
- Un sector privado decidido e involucrado en el mercado de los inoculantes, lo que ocurrirá sólo en el caso de una demanda elevada.

No obstante, a nivel internacional sería interesante la liberalización de los mercados y en especial el desarrollo de entidades o asociaciones a nivel internacional que delimiten unos estándares de producción y calidad que homogeneicen y estandaricen las normas de producción y calidad de los inoculantes (Philips, 2004), para conseguir una mejor imagen de este producto para los agricultores.

El presente estudio se ha estructurado siguiendo las indicaciones del programa de selección de Howieson *et al.* (2000) hasta la fase tercera de dicho programa, mediante la selección de rizobios nativos que nodulan alubia en la Indicación Geográfica Protegida "Alubia de La Bañeza-León". Para la identificación y caracterización se han incorporado herramientas de análisis de biodiversidad y caracterización polifásica de los aislados bacterianos puestas a punto en las Universidades de León y Salamanca. La selección basada en la eficiencia de fijación de N₂ de los aislados se ha llevado a cabo en experimentos de cultivo hidropónico y de cultivo en microcosmos en condiciones ambientales optimizadas en la Universidad de León, y finalmente en un experimento de campo para evaluar la eficiencia de fijación de N₂ en las condiciones edafoclimáticas del agrosistema en el que se cultiva la alubia y de donde son nativos los rizobios.

2. OBJETIVOS

El presente estudio se realizó entre octubre de 2005 y octubre de 2009 con el objetivo global de llevar a cabo una selección de rizobios autóctonos de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León" con capacidad para nodular y fijar N_2 atmosférico en simbiosis con alubia (*Phaseolus vulgaris* L.). La selección de estos aislados estuvo basada en su aptitud como potenciales cepas de rizobios empleadas en la fabricación de inoculantes. Para cumplir este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos concretos:

1. Obtención de una colección de aislados de rizobios que nodulan alubia procedentes de diferentes suelos de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León" y su preservación en las instalaciones de la Universidad de León
2. Caracterización fenotípica, genotípica y simbiótica de los aislados de la colección
3. Evaluación de la capacidad infectiva y eficiencia de fijación de N_2 de los aislados en alubia de la variedad "Riñón" en condiciones de cámara de crecimiento en cultivo hidropónico
4. Evaluación de la eficiencia de fijación de N_2 de cinco aislados de élite obtenidos anteriormente en plantas de alubia cultivadas en condiciones de microcosmos durante tres años consecutivos y sobre dos suelos diferentes de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León"
5. Evaluación de la eficiencia de fijación de N_2 de tres aislados de élite en plantas de alubia cultivadas en un experimento de campo llevado a cabo en tres ambientes diferentes analizando los tratamientos de sistema de laboreo (tres sistemas: siembra directa, laboreo convencional y laboreo convencional con una cubierta de centeno semienterrada) y los tratamientos de inoculación (tres rizobios eficientes en la fijación de N_2 frente a testigos).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de aislados

3.1.1. Recogida y conservación de nódulos de alubia

La obtención de rizobios con capacidad para nodular alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León" (IGP) se llevó a cabo a partir de la recolección de nódulos de plantas cultivadas de la variedad "Riñón" y su posterior aislamiento en el laboratorio. La recogida de nódulos tuvo lugar en parcelas cultivadas de alubia en estado de floración en 2005 y 2006 (mediados del mes de julio), seleccionándose 15 plantas aleatoriamente en distintos puntos de las parcelas. Las plantas fueron extraídas del suelo con su sistema radicular. Los nódulos con una morfología típica y coloración rojiza fueron introducidos en recipientes herméticos con cloruro cálcico (CaCl_2) como agente secante. Los suelos de donde proceden los aislados fueron analizados, presentándose los valores en la tabla 3.

Tabla 3. Características del suelo de las parcelas de origen de los nódulos

SUELO	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3	Suelo 4	Suelo 6	Suelo 7
Arena (%)	54	56	40		48	50
Limo (%)	34	32	48		30	30
Arcilla (%)	12	12	12		22	20
pH	6,7	6,3	5,1		6,7	6,7
Carbonatos (% caliza)	lp	lp	lp	lp	lp	lp
Mat orgánica (%)	1,57	1,83	2,36		1,37	1,38
N total (%)	0,11	0,12	0,17		0,10	0,10
Relación C/N	8,31	8,77	8,14		7,84	7,72
P (Olsen, ppm)	31,53	40,27	89,86		14,51	27,98
K (meq 100g ⁻¹)	0,51	0,71	0,79		0,42	0,67
Ca (meq 100g ⁻¹)	4,86	4,96	1,61		5,54	5,75
Mg (meq 100g ⁻¹)	0,70	0,80	0,78		1,72	1,60
Na (meq 100g ⁻¹)	0,02	0,02	0,08		0,08	0,07
CIC (meq 100g ⁻¹)	6,51	6,75	3,37		8,15	8,38

SUELO	Suelo 9	Suelo 10	Suelo 11	Suelo 12	Suelo 14	Suelo 19
Arena (%)	62	44	36	30	54	46
Limo (%)	30	46	52	56	32	32
Arcilla (%)	8	10	12	14	14	22
pH	6,8	7,0	6,6	7,0	6,96	8,50
Carbonatos (% caliza)	lp	lp	lp	lp	lp	7,78
Mat orgánica (%)	1,37	1,50	1,55	1,43	1,36	1,27
N total (%)	0,10	0,11	0,12	0,12	0,10	0,10
Relación C/N	7,75	7,96	7,27	7,59	7,70	7,23
P (Olsen, ppm)	45,30	32,57	33,75	29,16	51,29	29,99
K (meq 100g ⁻¹)	0,48	0,18	0,38	0,29	0,36	0,46
Ca (meq 100g ⁻¹)	4,14	6,34	6,54	5,79	5,26	16,64
Mg (meq 100g ⁻¹)	1,05	1,21	1,09	0,99	0,83	2,45
Na (meq 100g ⁻¹)	0,03	0,07	0,27	0,20	0,04	0,21
CIC (meq 100g ⁻¹)	6,14	8,39	9,03	7,64	8,08	12,43

3.1.2. Aislamiento y conservación de los aislados bacterianos

Los nódulos deshidratados fueron conservados en oscuridad a temperatura ambiente en el laboratorio hasta su rehidratación en agua destilada durante 6 h a 4 °C. Los nódulos rehidratados se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en una solución de HgCl₂ al 0,5% durante 3 minutos, seguida de sucesivos lavados en agua destilada estéril. Los nódulos esterilizados superficialmente fueron aplastados para la liberación de las bacterias viables del interior del nódulo hasta la obtención de una suspensión viscosa de las partes fragmentadas del nódulo. Esta suspensión fue sembrada sobre medio de cultivo YMA (Vincent, 1970; tabla 4). El medio inoculado fue incubado a 28 °C entre 48 y 96 horas llevándose a cabo sucesivas resiembras hasta obtener colonias aisladas.

Se seleccionaron las colonias con morfología típica de *Rhizobium* y se inocularon en caldo YMB (tabla 4), donde se mantuvieron a 28 °C durante 96 horas, mezclándose después con glicerol al 30% como agente crioprotector para su conservación a -84 °C.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo YMA (Vincent, 1970)

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada, c.s.p.	1,0 L

3.2. Caracterización genotípica

3.2.1. Extracción y purificación del ADN

El ADN bacteriano se extrajo a partir de colonias del aislado en crecimiento sobre medio TY (tabla 5) tras 48 h de incubación. La masa bacteriana recogida en un microtubo se suspendió en 200 µL de agua destilada estéril y se sometió a una centrifugación a 12000 rpm durante 30 s en una centrífuga SIGMA 1-14 (Sartorius, Alemania). Posteriormente se descartó el agua y el sedimento se resuspendió en una suspensión acuosa al 0,1% de N-laurilsarcosina y se centrifugó de nuevo. La rotura de las células se llevó a cabo tras resuspender el sedimento en 100 µL de NaOH 0,05M y sometiéndolo a calor a 100 °C durante 4 minutos. A continuación se añadieron 200 µL de agua y se centrifugó a 12000 rpm durante 3 minutos para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante obtenido (donde está disuelto el ADN bacteriano) se transfirieron 200 µL a un nuevo microtubo, para realizar la purificación y retirada de proteínas del ADN. En primer lugar se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando vigorosamente y centrifugando a

12000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. La fase superior se trasvasó a un nuevo microtubo y se adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó nuevamente por agitación y se centrifugó de la misma forma. De nuevo, el sobrenadante se transfirió a otro microtubo para realizar la precipitación del ADN mediante la adición de 0,07 volúmenes de acetato de sodio a pH 5,2 (Fluka, Alemania) y 4 volúmenes de etanol absoluto a 20 °C (Merck, Alemania). Se mezcló suavemente y se mantuvo a -20 °C durante al menos 12 horas. Pasado este tiempo, se sometió a una centrifugación a 4 °C durante 20 minutos a 12000 rpm y se retiró el sobrenadante, quedando el ADN precipitado y sedimentado, que se secó a 37 °C durante 1 h, y posteriormente se disolvió en 200 µL de agua destilada estéril a 42 °C de temperatura durante 15 minutos. Finalmente se hicieron varias alícuotas de la dilución de ADN para su conservación a -20 °C.

Tabla 5. Medio de cultivo TY

Compuesto	Cantidad
CaCl ₂	0,9 g
Extracto de levadura	3,0 g
Triptona peptona (DIFCO)	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada, c.s.p.	1,0 L

3.2.2. Amplificación del ADN para obtener perfiles de TP-RAPD

Para la caracterización genotípica y clasificación taxonómica de los aislados se emplearon las técnicas basadas en la amplificación del ADN mediante PCR por su idoneidad y fiabilidad. Los perfiles de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) demostraron ser útiles, sin embargo presentan el problema de la variabilidad de los perfiles dentro de una misma subespecie, por lo que se empleó una técnica que genera perfiles de bandas no dependientes de cepa. La técnica TP-RAPD emplea dos cebadores universales diseñados a partir del gen ribosómico 16S de *Escherichia coli*, con un alto contenido en G+C, lo que hacen que, junto con una temperatura de anillamiento relativamente alta, se produzca en una reacción de PCR una amplificación parcial del gen ribosómico 16S pero además la aparición de una serie de bandas de ADN por la inespecificidad de su anillamiento en otras regiones (Rivas *et al.*, 2001). Esta técnica presenta perfiles similares a nivel de subespecie, con las ventajas de la repetitividad, la facilidad de realización y la rapidez (Igual *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2002), por lo que fue empleada en el agrupamiento inicial, ya que se acepta el agrupamiento por perfiles similares para reducir el número de aislados que deben ser sometidos a la secuenciación de su ADN. Los cebadores 879F (5' GCCTGGGGAGTACGGCCGCA 3') y 1522R (5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3') (Rivas *et al.*, 2001), se emplearon en una reacción de PCR con los componentes, las concentraciones y los volúmenes que se presentan en la tabla 6.

El kit “AmpliTaq Gold reagent kit” (Perkin-Elmer Biosystems, EE.UU.) incluyó el cloruro de magnesio, el tampón de PCR y la *Taq* polimerasa. Se utilizaron los dNTPs de Pharmacia (EE.UU.) y la seroalbúmina bovina (BSA) de Sigma (EE.UU.).

Las condiciones de temperatura y tiempo de cada fase de los ciclos de PCR fueron establecidas dependiendo de cada método (tabla 7).

Tabla 6. Reactivos empleados en la PCR de TP-RAPD

Compuesto (concentración inicial)	Volumen de reacción (µL) TP-RAPD
Agua estéril	8,6 µL
Tampón de PCR (10x)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	5,0 µL
dNTPs (10 µM)	0,5 µL
Cebador 879F (20 µM)	2,0 µL
Cebador 1522R (20 µM)	2,0 µL
BSA (0,1%)	1,0 µL
Taq polimerasa (0,5 U µL ⁻¹)	0,4 µL
ADN molde	3,0 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 7. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR para TP-RAPD

Fase	TP-RAPD	
Predesnaturalización	95°C 10'	
35 ciclos	<i>Desnaturalización</i>	94°C 1'
	<i>Anillamiento</i>	50°C 1'
	<i>Extensión</i>	72°C 1'
Extensión final	72°C 7'	
Conservación	4°C ∞	

3.2.3. Amplificación del gen ribosómico 16S, el espaciador intergénico 16S-23S rDNA y los genes *recA*, *atpD* y *nodC*

Aunque se haya generalizado el empleo del gen ribosómico 16S como principal marcador filogenético para identificar especies bacterianas, dentro de la familia *Rhizobiaceae* se han observado similitudes tan elevadas que fue necesario requerir nuevos marcadores que afiancen la filogenia obtenida con el gen ribosómico 16S y a su vez tengan mayor exactitud en la identificación (Kwon *et al.*, 2005; Gaunt *et al.*, 2001). En este estudio se obtuvieron las secuencias del gen ribosómico 16S, los genes *housekeeping recA* y *atpD* (Gaunt *et al.*, 2001) y el espaciador intergénico 16S-23S rDNA (ITS, Kwon *et al.*, 2005) para cada uno de los perfiles TP-RAPD diferentes. También el *nodC* (Laguerre *et al.*, 2001) se secuenció con el fin de tener en cuenta el origen de relaciones simbióticas de los aislados con la planta hospedadora. Para llevar a cabo esa secuenciación, se hizo una PCR para la amplificación del fragmento buscado.

El ADN bacteriano se amplificó mediante la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Esta técnica es empleada tanto para la obtención de perfiles de TP-RAPD como para obtener copias de los fragmentos de ADN que se van a secuenciar posteriormente. De esta forma, la mezcla de reactivos es diferente así como las concentraciones y la naturaleza de los mismos en función del producto final de PCR.

La amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S fue realizada con los cebadores 800R y 518F por los servicios de secuenciación de Macrogen (Corea del Sur) a partir de suspensiones en glicerol de masa celular de los aislados sobre medio TY.

La tabla 8 muestra los componentes, concentraciones y volúmenes empleados para la amplificación del ITS y los genes *nodC*, *recA* y *atpD*, y la tabla 9 muestra los cebadores empleados para cada uno de los genes.

Las condiciones de temperatura y tiempo de cada fase de los ciclos de PCR fueron establecidas dependiendo del fragmento de ADN que se amplificó (tabla 10).

Tabla 8. Reactivos empleados en la PCR del ITS, *recA*, *atpD* y *nodC*

Compuesto (concentración inicial)	Volumen de reacción (µl) ITS (2 reacciones)	Volumen de reacción (µl) <i>recA</i> , <i>atpD</i> , <i>nodC</i>
Agua estéril	17,6 µL	20,4 µL
Tampón de PCR (10x)	5,0 µL	7,5 µL
Cl ₂ Mg (25 mM)	10,0 µL	18,0 µL
dNTPs (10 µM)	1,0 µL	1,5 µL
Cebador F (2 µM)	4,0 µL	7,5 µL
Cebador R (2 µM)	4,0 µL	7,5 µL
BSA (0,1%)	2,0 µL	3,0 µL
Taq polimerasa (0,5 U µL ⁻¹)	0,4 µL	0,6 µL
ADN molde	6,0 µL	9,0 µL
Volumen final	50 µL	75 µL

Tabla 9. Cebadores para la amplificación de ADN

Fragmento de ADN	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Referencia
ITS	FGPS1490 (F)	TGCGGCTGGATCACCTC CTT	Laguerre <i>et al.</i> , 1996 Las posiciones hacen referencia a la numeración de la secuencia del ADN ribosómico 16S y 23S, respectivamente, de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (NC010468).
	FGPL132' (R)	CCGGGTTTCCCATTCG G°	
<i>recA</i>	<i>recA</i> 1F	CGKCTSGTAGAGGAYAA ATCGGTGGA	Gaunt <i>et al.</i> , 2001 Las posiciones hacen referencia al primer nucleótido a partir del primer de la secuencia del gen <i>recA</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> VF39 (X59956) y del gen <i>atpD</i> de <i>Rhodobacter capsulatus</i> B100 (X99599).
	<i>recA</i> 4R	CGRATCTGGTTGATGAA GATCACCAT	
<i>atpD</i>	<i>atpD</i> 1F	SCTGGGSCGYATCMTGA ACGT	
	<i>atpD</i> 3R	GCCGACACTCCGAACC NGCCTG	
<i>nodC</i>	<i>nodC</i> F	AYGTHGTYGAYGACGGT TC	Laguerre <i>et al.</i> , 2001 Las posiciones hacen referencia a la secuencia del gen <i>nodC</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370T.
	<i>nodC</i> I	CGYGACAGCCANTCKCT ATTG	

Tabla 10. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR

Fase		ITS	<i>recA-atpD-nodC</i>
Predesnaturalización		95°C 10'	95°C 9'
35 ciclos	<i>Desnaturalización</i>	94°C 1'	94°C 1'
	<i>Anillamiento</i>	54°C 1,5'	55°C 1'
	<i>Extensión</i>	72°C 2'	72°C 2'
Extensión final		72°C 7'	72°C 7'
Conservación		4°C ∞	4°C ∞

3.2.4. Electroforesis del ADN

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa (SeaKem LE, LONZA, EE.UU.). La concentración de agarosa del gel fue del 1,5% para el producto de TP-RAPD y del 1% cuando la finalidad era obtener una única banda limpia de impurezas destinada a la secuenciación del fragmento de ADN incluido en esa banda. Se empleó como tampón de electroforesis TBE (Tris-borato-EDTA) a pH 8,5 para perfiles de TP-RAPD y TAE (Tris-acético-EDTA) (AppliChem GmbH, Alemania) cuando la electroforesis se hacía previa a la secuenciación del ADN. A 25 µL del producto de PCR obtenido se le añadieron 8 µL del tampón de carga (40% sacarosa y 0,05% azul de bromofenol). Como marcador se utilizó el DNA Molecular Weight Marker VI (Roche, Alemania) en una dilución 1:4.

La electroforesis se llevó a cabo durante dos horas aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm y utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad, EE.UU.).

Los geles se tiñeron con una disolución de bromuro de etidio (Sigma, EE.UU.), de 0,5 µg mL⁻¹, durante 30 minutos y se fotografiaron con luz ultravioleta utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EE.UU.).

3.2.5. Secuenciación de fragmentos de ADN

Los cebadores empleados en la mezcla de reacción de PCR para la secuenciación de ADN se presentan en la tabla 9. El producto de PCR se sometió a electroforesis para la separación del fragmento amplificado, que será objeto de secuenciación, de posibles impurezas y otras bandas de amplificación minoritaria. La banda que correspondió al fragmento de ADN esperado por comparación con el marcador de pesos moleculares Standard VI (Roche, Alemania) se cortó bajo luz ultravioleta. El ADN incluido en la agarosa fue purificado empleando el kit Ultraclean 15 DNA Purification Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (MoBio Lab. Inc., EE.UU.) y suspendido finalmente en agua para su secuenciación con los cebadores correspondientes al fragmento a secuenciar. El ADN purificado fue resuspendido en 13 µL de agua destilada, y luego se separó en dos microtubos, a los que se añadió 6,5 µL del ADN y 3 µL del cebador para la secuenciación

independiente con el cebador F (*forward*) y R (*reverse*). La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, donde se obtuvieron las secuencias de ADN utilizando el kit “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” y utilizando el equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystems, EE.UU.).

Los fragmentos generados con el cebador F y el cebador R de una misma secuencia se ensamblaron mediante el programa GeneTool Lite 1.0 (BioTools Inc., EEUU).

3.2.6. Análisis de las secuencias de ADN

El análisis filogenético de las secuencias de ADN comenzó con el alineamiento múltiple de las secuencias junto con las del mismo fragmento de ADN de las cepas tipo del género *Rhizobium* (de libre acceso en GenBank, NCBI, EE.UU.) mediante el programa Clustal X2 (Jeanmougin *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1997). Con el paquete informático MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2001) se construyeron los árboles filogenéticos, empleando el método de construcción de árboles Neighbour-Joining con un “bootstrap” de 1000 (Saitou & Nei, 1987), y el coeficiente de similitud de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980). Además, se obtuvieron una tablas que presentaron los porcentajes de identidad a partir del programa Clustal X2 mediante la aplicación PHYDIT 3.1 (Chun, 2001).

3.3. Análisis de las características fenotípicas

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

Los aislados bacterianos fueron inoculados en medios de cultivo en diferentes condiciones para evaluar su capacidad de crecimiento en cada una de ellas. Para obtener estas condiciones, se preparó medio de cultivo YMA con valores de pH ajustados a 5, 6 y 8 para evaluar el crecimiento en diferentes condiciones de acidez. El crecimiento en varias concentraciones salinas se evaluó mediante la adición de NaCl al medio YMA para obtener concentraciones salinas de 0,5%, 1%, 1,5%, 2% y 2,5%. Cuando se trató de observar el crecimiento a diferentes temperaturas también se utilizó el medio de cultivo YMA, y se incubó a temperaturas de 4 °C y 12 °C para observar el crecimiento en condiciones psicrófilas, y a 37 °C y 45 °C para el crecimiento en condiciones termófilas. En todos los casos, transcurridos 7 días se observó el crecimiento.

3.3.2. Resistencia Natural a Antibióticos

La resistencia a antibióticos se observó mediante la aplicación de diversos discos de antibióticos (tabla 11) sobre una placa de medio de cultivo YMA previamente inoculada en toda su superficie con una suspensión de células de 10^8 UFC mL⁻¹ de los aislados evaluados. Igualmente se emplearon cepas de referencia para la evaluación de la resistencia natural a antibióticos, que fueron propuestas tras conocer la relación taxonómica con éstas de los aislados. Tras la incubación de las cepas a 28 °C durante 96 horas se observó la presencia de halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de antibiótico cuando el aislado fue sensible. En el resto de la placa se observó un crecimiento homogéneo del microorganismo. En el caso de resistencia natural al antibiótico por parte del aislado, el crecimiento alrededor del disco será similar al del resto de la placa, sin apreciarse un halo de inhibición del crecimiento.

Tabla 11. Antibióticos empleados en la prueba de resistencia

Antibiótico	Cantidad por disco
Ampicilina (Oxoid, Reino Unido)	2 µg
Cefuroxima (Oxoid, Reino Unido)	30 µg
Ciprofloxacina (Oxoid, Reino Unido)	5 µg
Cloxaciclina (Oxoid, Reino Unido)	1 µg
Eritromicina (Oxoid, Reino Unido)	2 µg
Gentamicina (Oxoid, Reino Unido)	10 µg
Neomicina (Oxoid, Reino Unido)	5 µg
Oxitetraciclina (BBL, Francia)	30 µg
Penicilina (Oxoid, Reino Unido)	10U.I.
Polimixina B (BBL, Francia)	300U.I.

3.3.3. Utilización de Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Para la evaluación de la capacidad de los aislados para utilizar una determinada fuente de carbono se preparó el medio mínimo Bergensen modificado (sin fuente de carbono, tabla 12) al que se añadió la fuente de carbono correspondiente. Cuando se evaluó el crecimiento empleando aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno el medio Bergensen se modificó además retirando de su preparación el nitrato amónico. La tabla 13 incluye las sustancias evaluadas como fuentes de C (azúcares, polialcoholes y ácidos orgánicos) y como fuentes de C y N (aminoácidos). La solución de vitaminas se preparó disolviendo los ingredientes en tampón Na₂HPO₄ 0,05M (pH 7). Las sales con los elementos traza se disolvieron en agua destilada, el pH de la solución resultante se ajustó a 5 y se añadió 1g L⁻¹ de EDTA. El medio Bergensen modificado se ajustó a un valor de pH 7 y se esterilizó previamente a la adición de la fuente de C o de C y N, que fue posteriormente disuelta en agua destilada y esterilizada por filtración con membrana de 0,22 µm, del mismo modo que se hizo con las soluciones de vitaminas y de elementos traza. El medio con cada una de las

fuentes de C o C y N fue extendido en pacas petri, sobre las cuales se sembraron ocho aislados en cada una, provenientes de un cultivo previo en YMA durante tres días a 28 °C para tener un crecimiento activo de los aislados en el momento de la inoculación en los medios con diferentes fuentes de C y de C y N. Las placas se incubaron a 28 °C durante siete días y se valoraron como positivos los aislados en los que se observó crecimiento.

Tabla 12. Medio Bergensen modificado

Compuesto	Cantidad
Fuente de Carbono o de Carbono y Nitrógeno	7,00 g
K ₂ HPO ₄ (Fluka, Alemania)	0,20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Fluka, Alemania)	0,20 g
NH ₄ NO ₃ (Fluka, Alemania)	0,10 g
NaCl (Fluka, Alemania)	0,10 g
Azul de bromotimol (Sigma, EE.UU.)	0,05 g
Solución de vitaminas	1 mL
Solución de elementos traza	1 mL
Agar (Conda, España)	20,00 g
Agua destilada, c.s.p.	1 L
SOLUCIÓN DE VITAMINAS	
Riboflavina	20,0 mg
Ácido P-amino benzoico	20,0 mg
Ácido nicotínico	20,0 mg
Biotina	20,0 mg
Tiamina-HCl	20,0 mg
Piridoxina-HCl	20,0 mg
Pantotenato cálcico	20,0 mg
Inositol	120,0 mg
ELEMENTOS TRAZA	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	6,6 mg
H ₃ BO ₃	145,0 mg
FeSO ₄ ·H ₂ O	145,0 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	59,0 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5,0 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4,3 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	108,0 mg
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	125,0 mg

Tabla 13. Fuentes de C y de N

Azúcares	Polialcoholes	Ácidos orgánicos	Aminoácidos
D-rafinosa	Xilitol	Piruvato Na	L-serina
Galactosa	D-sorbitol	Glucuronato Na	DL-valina
Maltosa	Meso-eritritol	Propionato Na	L-alanina
D-celobiosa	Inositol	Gluconato Na	L-prolina
Melibiosa	Manitol	Citrato Na	Betaina
D-sacarosa			L-arginina
D-salicina			L-lisina
D-trehalosa			L-histidina
L-ramnosa			Sarcosina
L-sorbosa			Aspartato Mg
D-manosa			Glutamato Na
Fructosa			
Xilosa			
Melezitosa			

3.3.4. Bioquímica

3.3.4.1 Producción de ureasa

Para la evaluación de la producción de esta enzima se empleó el caldo de urea (Fluka, Alemania) en viales de 2 mL. Este medio incluye un indicador de color, de forma que en el momento de su preparación el medio presenta un color anaranjado, que cambia a fucsia intenso cuando se produce la hidrólisis de la urea. En estos tubos se inocularon los aislados así como las cepas de referencia empleadas como controles. La incubación se realizó a 28 °C durante 96 horas.

3.3.4.2 Hidrólisis de celulosa

Las cepas se sembraron en placas que contenían carboximetil celulosa (CMC) como fuente de carbono (medio YEC), incubándolas durante siete días a 28 °C. Para detectar la producción de celulasas, las placas se tiñeron con rojo congo al 0,1%, durante 30 minutos y se lavaron varias veces con una solución de NaCl 1M. La aparición de halos transparentes alrededor de las colonias indica la producción de celulasas.

3.3.4.3. Hidrólisis de almidón

Se sembraron las cepas en placas con medio que contenía almidón y se incubaron durante siete días a 28 °C. La actividad hidrolítica se detectó añadiendo lugol, que tiñe el almidón no hidrolizado. La aparición de zonas claras no teñidas alrededor del crecimiento bacteriano indica una hidrólisis del almidón.

Para la preparación del medio, el almidón, el extracto de levadura y la mitad del agua se esterilizaron por un lado y el agar con el resto de agua por otro, mezclándose después en caliente para conseguir una completa homogeneización.

3.3.4.4. Solubilización de fosfato

Los aislados se inocularon en placas que contenían medio YED-P (extracto de levadura 0,5%, glucosa 1% y agar 2%), sobre el que se colocó 6 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂, insoluble, que origina una turbidez blanquecina característica del medio. En este medio los aislados fueron incubados durante siete días a 28 °C. La capacidad para la solubilización de fosfato se observó por la aparición de un halo transparente en el medio de cultivo en torno a las colonias que son capaces de solubilizar el fosfato tricálcico.

3.3.4.5. Otras actividades enzimáticas

Para estudiar la producción de otros enzimas, se utilizó una serie de sustratos enzimáticos compuesta por 32 sustancias comerciales (Sigma, EE.UU.) que contienen paranitrofenol como grupo cromogénico (tabla 14). Las sustancias se resuspendieron en tampón fosfato 0,2M a pH 7 excepto las que requieren pH 8,5 que se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,2M y los de pH 5 que se resuspendieron en tampón acetato 0,2M. La detección de la actividad enzimática de los aislados se llevó a cabo sobre placas multipocillo utilizando 30 μ l de sustrato y 30 μ l de una suspensión de células del aislado procedente de un cultivo de una semana a 28 °C en medio Bergensen modificado sin indicador. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h y posteriormente se añadió en cada pocillo una cantidad de 50 μ l de carbonato sódico en solución al 4%. Esta solución contribuye a alcalinizar el contenido del pocillo, con lo que presenta una coloración amarilla intensa debido al paranitrofenol, liberado cuando el sustrato es hidrolizado (actividad enzimática positiva).

Tabla 14. Sustratos para la evaluación de actividad enzimáticas

Acetato	PNP – α - D - galactopiranosido
PNP – hidrosuccinimida	PNP – β - D - galactopiranosido
PNP – N – acetil - β - D - galactosaminido	PNP – α - D - galacturónido
PNP – N – acetil - α - D - galactosaminido	PNP – α - D - glucopiranosido
PNP – α - L - arabinopiranosido	PNP – β - D - glucopiranosido
PNP – β - L - arabinopiranosido	PNP – β - D - glucurónido
PNP – β - D – celobiósido	PNP – β - D - lactopiranosido
PNP – D – fenilalanina	PNP – α - D - maltopiranosido
PNP – fosfato pH 5,0	PNP – β - D - maltopiranosido
PNP – fosfato pH 7,0	PNP – α - D - manopiranosido
PNP – fosfato pH 8,5	PNP – β - D - manopiranosido
PNP – bis - fosfato pH 7,0	PNP – α - L - ramnopiranosido
PNP – bis - fosfato pH 8,5	PNP – sulfato
PNP – nitrofenil fosforilcolina	PNP – tioglucopiranosido
PNP – α - L - fucopiranosido	PNP – α - D - xilopiranosido
PNP – β - D - fucopiranosido	PNP – β - D - xilopiranosido

3.3.5 Agrupamiento fenotípico

Los datos fenotípicos obtenidos en las condiciones descritas en los apartados 2.3.1 a 2.3.4 fueron codificados en forma binaria (1 para positivo y 0 para negativo). Posteriormente se analizaron los datos utilizando el coeficiente de Jaccard para obtener la matriz de similitud y el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) para obtener un dendrograma que refleje la distancia entre los fenotipos de los aislados con el paquete informático SPSS Statistics 17 (SPSS Inc., EE.UU.).

3.4. Análisis de la infectividad y eficiencia de fijación de N₂ en cultivo hidropónico

Los aislados obtenidos a partir de los nódulos fueron inoculados en plantas de alubia de la variedad local "Riñón" con la finalidad de observar su capacidad infectiva como microsimbiontes (presencia de nódulos) y determinar su eficiencia de fijación de N₂. Para ello se estableció una serie de experimentos en condiciones de esterilidad, lo que previene cualquier influencia de otros microorganismos en el establecimiento de la simbiosis, optimizando otros factores como temperatura, humedad, iluminación, sustrato y nutrientes. La aportación del rizobios a la planta en su relación simbiótica es en forma de compuestos nitrogenados a partir del nitrógeno atmosférico, por lo que es necesario excluir este elemento del sustrato para observar diferencias entre los aislados, estableciendo el N de este modo como factor limitante.

3.4.1. Producción y cultivo de plantas de alubia en cultivo hidropónico estéril

Las semillas de alubia fueron desinfectadas superficialmente antes de la siembra en una solución de HgCl₂ 0,5% durante 3 minutos y posteriores lavados con agua destilada estéril para retirar 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 emplearon vasos opacos de polietileno de 1 L de capacidad con orificio inferior colocados sobre un recipiente inferior que sirvió como reservorio de la solución de riego, ambos desinfectados superficialmente con una solución acuosa de etanol al 70%. Cuatro semillas desinfectadas fueron colocadas a dos centímetros de profundidad en la vermiculita ya distribuida en los recipientes. Posteriormente se añadió un volumen de 250 mL de agua destilada estéril en los reservorios para el mantenimiento de la humedad en el sustrato. Siete días después de la siembra se retiraron las plantas emergidas sobrantes para dejar dos plantas de alubia por recipiente. Los nutrientes para la planta fueron aportados en forma de una solución nutritiva estéril (Rigaud & Puppo, 1975) libre de nitrógeno (tabla 15) en dos aplicaciones a lo largo del ciclo del cultivo.

Tabla 15. Solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud & Puppo, 1975)

Compuesto	Contenido
KH ₂ PO ₄	0,200 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,200 g
KCl	0,200 g
EDTA Fe Na ₂ (Sigma, EE.UU.)	0,025 g
Na ₂ MoO ₄ (Panreac, España)	0,004 g
H ₃ BO ₃ (Panreac, España)	0,018 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O (Panreac, España)	0,020 g
ZnSO ₄ (Panreac, España)	0,003 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Panreac, España)	0,002 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

El cultivo de la alubia 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 la termoperíodo (24 °C durante las horas de luz y 18 °C durante las de oscuridad) y la humedad relativa, del 65% ± 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 (SN) y otro testigo también sin inocular pero añadiendo a la solución de Rigaud nitrógeno químico en forma de NH₄NO₃ 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 figura 13. El diseño experimental fue completamente aleatorizado.

3.4.2. Inoculación de las plantas con los aislados

Cada aislado fue producido de manera independiente en medio YMB para obtener un caldo con una concentración de células de al menos 10⁹ 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 en vermiculita en el entorno de la corona radicular de la plántula siete días después de la siembra de la alubia.

3.4.3. Análisis de la eficiencia de fijación de N₂ de cada aislado

Las plantas se secaron en estufa a 70 °C durante 72 h, tomando los datos de la biomasa aérea y subterránea, en la cual se incluían los nódulos. Además, se retiraron los nódulos de la raíz y se obtuvo el peso de los mismos.

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 estufaje 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				

Figura 13. Distribución temporal de las actividades realizadas en la cámara durante el cultivo de cada una de las tandas de plantas de alubia.

Las plantas fueron molturadas con un molino de martillos y el material vegetal fue analizado para determinar el contenido de N (%) mediante el método Kjeldahl y P, K, Ca, Mg (mg g^{-1}) mediante digestión (en 10 mL de ácido nítrico al 65% a 200 °C durante 20 minutos) y espectroscopía de emisión atómica ICP-AES. Estos datos permitieron calcular la cantidad total de estos elementos acumulada 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 la masa de los nódulos, el porcentaje de N en la biomasa aérea y el contenido de N, P, K, Ca y Mg en la biomasa aérea. El tratamiento de inoculación fue la variable independiente analizada en el ANOVA y consistió en los 48 aislados bacterianos y seis controles sin inocular.

Los datos de eficiencia de fijación de N_2 y el porcentaje de N 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 N_2 a un cultivo que recibe una cantidad de N equivalente a su demanda (Beck *et al.*, 1993):

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

3.4.4. Segunda fase del análisis de la eficiencia de fijación de N₂ en cultivo hidropónico

Los 18 aislados que produjeron un mayor contenido de N en la biomasa aérea de las plantas en la primera fase del experimento fueron sometidos a una confirmación de su eficiencia de fijación de N₂. Esta fase se llevó a cabo en las mismas condiciones de la primera fase, con el mismo cronograma y con los controles con N y sin N. A los 35 días de la siembra se retiraron las plantas y se procedió a la determinación de parámetros indicadores de la eficiencia de nitro fijación, realizando un análisis de varianza del contenido de N en la biomasa aérea para seleccionar los cinco aislados con mayor eficiencia de fijación de N₂, con la finalidad de someterlos a la selección en condiciones de microcosmos.

3.5. Selección de los aislados en condiciones de microcosmos

El comportamiento de los microorganismos puede ser diferente cuando se inoculan en condiciones de cultivo hidropónico sobre un sustrato estéril en comparación con la inoculación en el suelo. Aquí la influencia de la textura, las propiedades físico-químicas y la población microbiana del suelo pueden influir en la persistencia, infectividad y eficiencia de fijación de N₂ del aislado empleado como inóculo. Por esto se llevaron a cabo los experimentos de inoculación sobre suelo en invernadero, en condiciones de microcosmos.

El experimento de microcosmos se repitió tres veces, coincidiendo con los meses de primavera-verano de los años 2007, 2008 y 2009, en los invernaderos del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, en los terrenos de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (ESTIA) de la Universidad de León.

Se emplearon dos suelos y los tratamientos fueron la inoculación con los cinco aislados seleccionados en el cultivo hidropónico, un control no inoculado con fertilización nitrogenada mineral (nitrato amónico cálcico) (control con N) y un control no inoculado sin fertilización mineral nitrogenada (control sin N).

3.5.1. Elección de los suelos para el experimento de microcosmos

Los suelos empleados como sustrato en estos experimentos provinieron de dos localizaciones diferentes de la I.G.P.: Sueros de Cepeda y ESTIA (términos municipales de Villamejil y León, respectivamente). Ambas localizaciones fueron elegidas con el criterio de la disponibilidad de suelo y de agua para los futuros experimentos de campo y de la distancia física entre ellas (36,5 km) con el fin de tener dos suelos con diferencias en sus propiedades físico-químicas (tablas 16 y 17) y microbiológicas (contenido de rizobios que nodulan *Phaseolus*). En el suelo de Sueros se encontraron numerosos nódulos en todas las plantas extraídas cuando se hizo la colección de nódulos. El suelo de la ESTIA presentó un valor de pH en torno a 6,5 mientras el de Sueros es ligeramente superior a 7. También hubo diferencias en la textura del suelo y en su contenido en materia orgánica.

La evaluación de la presencia de rizobios de alubia en ambos suelos se analizó mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) (Beck et al., 1993). Para ello se preparó un cultivo hidropónico estéril en cámara de crecimiento como el descrito en el apartado 3.4.1 con una planta por recipiente. Siete días después de la siembra se inocularon cuatro plantas de alubia por cada una de las seis diluciones decimales de suelo. La primera dilución de 10^{-1} consistió en la mezcla de 1 g de suelo con 9 mL de solución acuosa de NaCl al 0,89% y se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} . La evaluación de la presencia de nódulos se realizó 42 días después de la siembra, siendo la cronología de las actividades similar a la de los experimentos en medio hidropónico estéril. Tras el recuento del número de plantas con presencia de nódulos, se emplearon las tablas de Fisher & Yates que presentan Beck *et al.* (1993), de donde se obtiene el valor de m para la fórmula que determina el número más probable $M = m \cdot d / v$; siendo el factor d la dilución más baja de la serie y v el volumen, en mL, de alícuota aplicada como inóculo ($v=1$).

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. Al remover el suelo se fueron retirando fragmentos grandes de piedras, y el suelo removido se vertió a recipientes de 15 L de capacidad, en los que fueron transportados hasta el invernadero.

3.5.2. Análisis de suelos y fertilización

Los suelos empleados para los experimentos de microcosmos fueron analizados por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León con los parámetros y resultados que aparecen en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Análisis del suelo ESTIA en los años 2007, 2008 y 2009

	ESTIA 2007	ESTIA 2008	ESTIA 2009
Arena (%)	46	30	26
Limo (%)	30	40	42
Arcilla (%)	24	30	32
pH	6,76	6,68	6,66
Carbonatos (% caliza)	lp	lp	lp
Materia orgánica (%)	4,16	4,89	5,28
Nitrógeno total (%)	0,27	0,33	0,33
Relación C/N	9,02	8,57	9,31
Fósforo (Olsen) (mg kg ⁻¹)	17,29	26,16	18,61
Calcio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	16,67	22,08	20,71
Magnesio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	1,96	2,72	2,80
Potasio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	0,22	0,23	0,28
Sodio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	0,10	0,11	0,15
C.I.C. (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	22,51	23,13	23,77
Manganeso (mg kg ⁻¹)	10,20	25,30	5,91
Hierro (mg kg ⁻¹)	41,70	48,78	42,89
Cobre (mg kg ⁻¹)	5,18	5,24	5,26
Zinc (mg kg ⁻¹)	0,70	0,82	1,41
Boro (mg kg ⁻¹)	2,54	2,07	1,38
Conductividad (dS m ⁻¹)	0,04	0,09	0,10

Tabla 17. Análisis del suelo Sueros en los años 2007, 2008 y 2009

	SUEROS 2007	SUEROS 2008	SUEROS 2009
Arena (%)	48	26	26
Limo (%)	38	54	42
Arcilla (%)	14	20	32
pH	7,72	7,43	7,80
Carbonatos (% caliza)	lp	lp	lp
Materia orgánica (%)	1,83	1,56	2,06
Nitrógeno total (%)	0,14	0,16	0,14
Relación C/N	7,48	5,82	8,33
Fósforo (Olsen) (mg kg ⁻¹)	140,28	117,44	77,18
Calcio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	8,37	6,62	3,90
Magnesio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	1,40	0,48	0,72
Potasio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	0,51	0,93	1,39
Sodio (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	0,02	0,02	0,06
C.I.C. (cmol ⁽⁺⁾ kg ⁻¹)	9,57	7,94	5,67
Manganeso (mg kg ⁻¹)	1,32	2,35	5,64
Hierro (mg kg ⁻¹)	21,30	34,06	97,84
Cobre (mg kg ⁻¹)	1,08	1,00	1,53
Zinc (mg kg ⁻¹)	1,61	1,54	1,60
Boro (mg kg ⁻¹)	1,80	0,43	0,58
Conductividad (dS m ⁻¹)	0,12	0,08	0,05

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 N del control con N. 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 elemento por parte del cultivo. Se consideró después la extracción individual por planta para un marco de plantación de 0,50 m · 0,15 m (133333 plantas ha⁻¹).

3.5.2.1. Fertilización nitrogenada

Se utilizó nitrato amónico cálcico (NAC, riqueza del 27%) calculando la dosis a partir de las extracciones medias de nitrógeno del cultivo de judía grano, que son de 55,5 kg N ha⁻¹ por 1000 kg de grano producido (Urbano Terrón, 2002). El rendimiento medio de la provincia de León para el cultivo de alubia en regadío fue de 2800 kg ha⁻¹ en 2008 (Consejería de Agricultura y Ganadería, 2009), por lo que las extracciones se calcularon sobre la base de un rendimiento de 3000 kg ha⁻¹ con el fin de que el N actúe como factor limitante de la producción. La extracción media del cultivo fue 166,5 kg ha⁻¹, y la extracción por planta fue de 1,25 g de nitrógeno, correspondiéndose con 4,63 g de NAC por planta.

3.5.2.2. Fertilización fosfatada

La fertilización fosfatada se basó en las extracciones esperadas del cultivo y el contenido edáfico de P. Las extracciones de P₂O₅ para un rendimiento de 3000 kg ha⁻¹ fueron 57 kg P₂O₅ ha⁻¹. La cantidad de fertilizante fosfatado es modificada con coeficientes que multiplican el valor de las extracciones de P₂O₅ del cultivo en función del nivel de fertilidad fosfórica del suelo, el valor de pH del mismo y la intensidad del sistema de cultivo (Urbano Terrón, 2002).

Todos los suelos presentaron un nivel de fertilidad medio (16 – 24 mg kg⁻¹) excepto los suelos de Sueros 2007 y 2009 que tenían valores muy altos, y no se aportó fertilización fosfatada en esos casos. El fertilizante aplicado fue el superfosfato simple de cal, con una riqueza en P₂O₅ del 16%, con lo que la aplicación total de superfosfato será la equivalente a 356,25 kg ha⁻¹. Este valor equivale a 2,68 g planta⁻¹ (tabla 18).

3.5.2.3. Fertilización potásica

La dosis de fertilizante potásico se calcula a partir de las extracciones de la planta y el nivel de K en el suelo. Las extracciones consideradas para un rendimiento de 3000 kg ha⁻¹ fueron de 120 kg K₂O ha⁻¹.

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 abono elegido (KCl, con una riqueza en K₂O del 37%), los aportes por planta fueron de 3,16 g en suelos de fertilidad baja, y de 2,43 g en suelos de fertilidad media (tabla 18).

Tabla 18. Resumen del plan de fertilización P y K del microcosmos.

	Necesidad es Alubia (‰)	Necesidades cultivo (3000 kg ha ⁻¹ producción)	Fertilizante (riqueza)	Suelo	Año	Contenido edáfico de P y K (mg kg suelo ⁻¹)	Factor Corrección	Fertilización (kg ha ⁻¹)	Fertilización (g planta ⁻¹)
P	19 kg (P ₂ O ₅)	57 kg ha ⁻¹	Superfosfato de cal simple (16% P ₂ O ₅)	ESTIA	2007	17,29 (M)	1,0	356,25	2,68
					2008	26,16 (A)	0,3	46,76	0,35
					2009	18,61 (M)	1,0	356,25	2,68
				SUEROS	2007	140,28 (MA)	0,0	0	0
					2008	117,44 (MA)	0,0	0	0
					2009	77,18 (MA)	0,0	0	0
K	37,5 kg (K ₂ O)	120 kg ha ⁻¹	Cloruro potásico (37%)	ESTIA	2007	1,96 (MA)	0,0	0	0
					2008	0,23 (B)	1,2	389,19	2,93
					2009	2,28 (B)	1,2	389,19	2,93
				SUEROS	2007	0,51 (M)	1,0	324,32	2,44
					2008	0,93 (MA)	0,0	0	0
					2009	1,39 (MA)	0,0	0	0

3.5.3. Diseño experimental del microcosmos

Las variables independientes fueron el año (2007, 2008 y 2009), el suelo (ESTIA y Sueros) y los tratamientos de inoculación. El número de plantas por tratamiento, suelo y año fue de 15. Cada planta ocupó una maceta de 15 L de capacidad, con lo que el total de macetas fue de 210 cada año, 105 por cada suelo. El diseño experimental fue en forma de bloques colocados al azar con 5 plantas por bloque y 3 repeticiones en el experimento de 2007 (figura 14) y en bloques de 3 plantas con 5 repeticiones en los años 2008 y 2009 (figura 15). El cambio de diseño se debió a la disponibilidad y distribución del espacio en el invernadero en los diferentes años. El tratamiento estadístico de los resultados se efectuó posteriormente para un diseño completamente aleatorizado.

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.

Los cinco aislados que presentaron la mayor eficiencia de fijación de N₂ en cultivo hidropónico fueron empleados como tratamientos de inoculación. La inoculación de las plantas se llevó a cabo en forma de cultivo líquido del aislado, empleando un volumen de inóculo de 10 mL con una concentración de al menos 10⁹ UFC mL⁻¹. (medio de cultivo líquido YMB durante siete días en agitación a 28 °C).

LEYENDA	
3	Inóculo LCS0306
6	Inóculo LEV0613
9	Inóculo LPZ0913
10	Inóculo ZBM1008
11	Inóculo LBM1123
N	Control No Nitrogeno
Q	Control Con Nitrato
E	suelo ESTIA
S	suelo Sueros

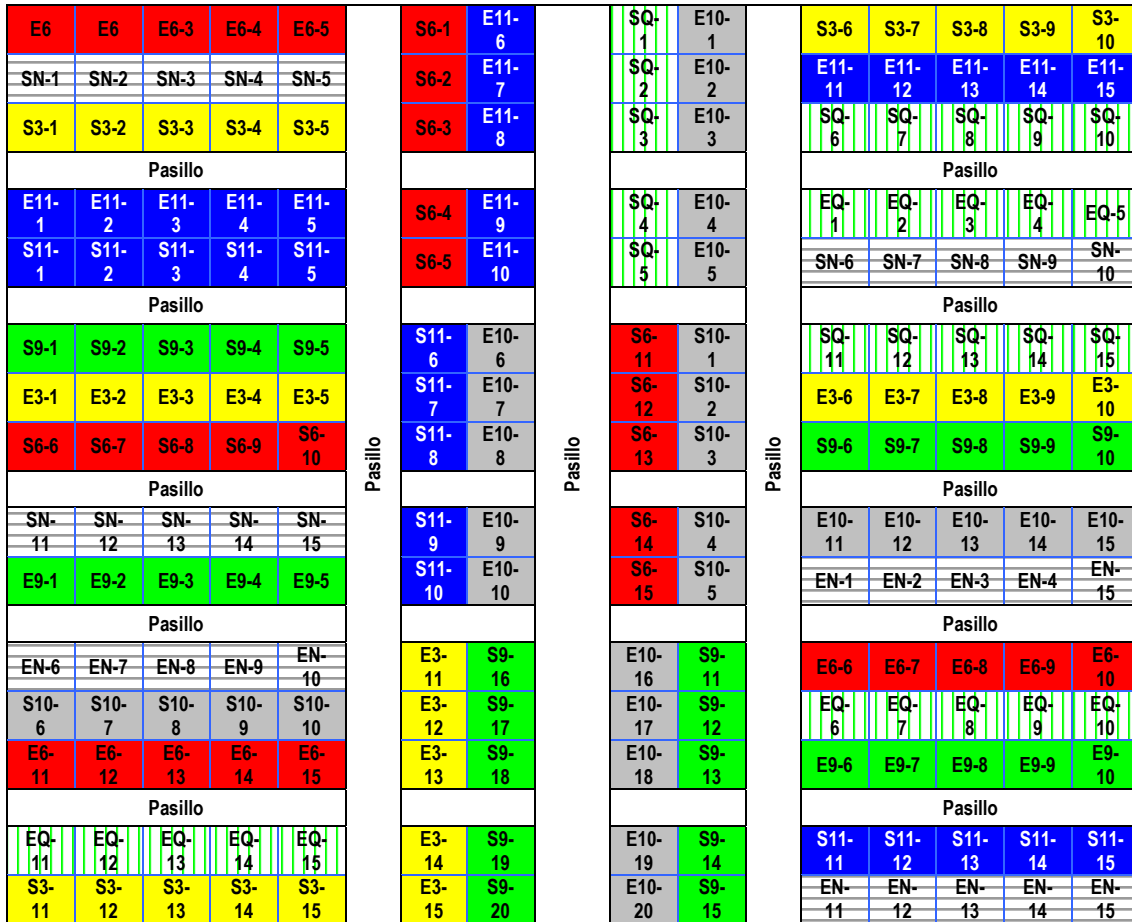


Figura 14. Disposición del experimento de microcosmos 2007

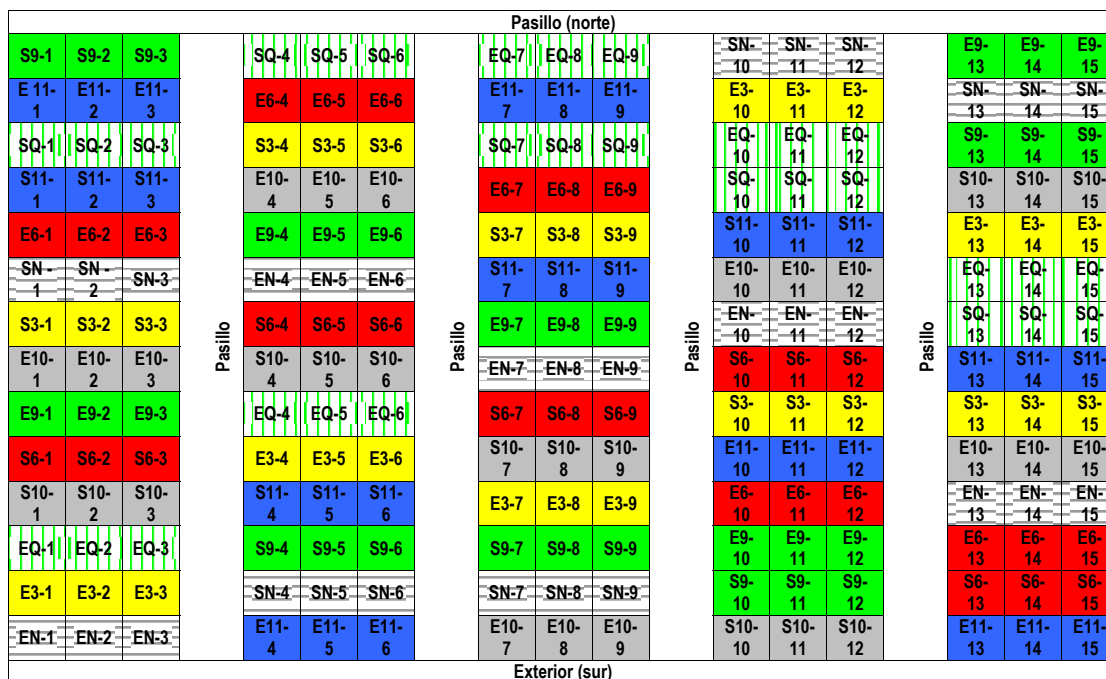


Figura 15. Disposición de los experimentos de microcosmos 2008 y 2009

3.5.4. Actividades durante el crecimiento de alubia en microcosmos

Se llevaron a cabo riegos semanales con un volumen de 1 L de agua no tratada con desinfectantes (pozo de la ESTIA) en cada maceta, con el objetivo de mantener un estado hídrico correcto en las plantas.

En los años 2007 y 2008 se realizaron dos tratamientos fitosanitarios en cada año contra los trips (*Frankliniella* sp.) con el insecticida metiocarb (Mesurol 50 PM, Bayer, España), y contra la araña roja (*Tetranychus urticae*) con el acaricida cihexaestán (ACARFLO, AFRASA, España) según las dosis recomendadas por los fabricantes. En 2009 fue necesario un tratamiento insecticida contra la aparición de trips con metiocarb.

Las plantas adventicias que aparecieron a lo largo del cultivo fueron retiradas manualmente tras los riegos semanales.

3.5.5. 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 aérea y la de las semillas de cada planta, y se contó el número de semillas y de vainas. La biomasa se determinó después de 72 h a 70 °C. Con los datos anteriores se calculó el número medio de semillas por vaina y el peso de 1000 semillas. Además, se molturaron las semillas

obtenidas con un molinillo de martillos para determinar su contenido de N (Kjeldahl) y así cuantificar el N presente en las semillas de cada planta. El último parámetro de rendimiento determinando fue el índice de cosecha de cada planta, obtenido como la relación entre el peso de las semillas y el total de la biomasa aérea.

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 1000 semillas, rendimiento (g planta^{-1}) y N total acumulado en las semillas (mg planta^{-1}).

3.6. Experimento de campo

3.6.1. Diseño experimental

El experimento de campo fue llevado a cabo durante dos años (2008 y 2009) y en dos emplazamientos diferentes, uno de ellos fue los terrenos de la ESTIA de la Universidad de León y el otro en la localidad de Sueros de Cepeda. El diseño experimental fue de parcelas divididas (*split-plot*). En el experimento, las fuentes de variación fueron los ambientes y los tratamientos, que a su vez se dividieron en sistema de laboreo en la parcela principal y tratamiento de inoculación en la subparcela.

3.6.1.1. Fuente de variación: ambientes

El diseño inicial incluía dos ambientes, 2008 y 2009, y dos localidades. La primera de ellas fue la ESTIA de la Universidad de León (término municipal de León) y la segunda fue la localidad de Sueros de Cepeda (municipio de Villamejil, León), a 36,5 km al oeste de León (figuras 16, 17 y 18). Sin embargo, durante el año 2008 la campaña de riego se vio limitada por la escasez de agua para el riego en el pantano de Villameca, con lo que fue inviable el establecimiento del experimento en Sueros y el diseño final del experimento de campo combinó años y localidades en tres ambientes: ESTIA 2008, ESTIA 2009 y Sueros 2009.

3.6.1.2. Fuente de variación: tratamientos

Tratamiento: sistema de laboreo

La parcela principal del experimento fue la correspondiente al sistema de laboreo:

- Laboreo convencional (LC), basado en el empleo del arado de discos o vertedera (volteo de la tierra) seguido de gradeos sucesivos para la preparación del lecho de siembra.
- Laboreo convencional seguido de siembra y enterrado de centeno (CC). El centeno se sembró en dosis de 150 kg ha^{-1} de semilla a mediados de febrero de 2008 y 2009. La cubierta se enterró antes de la siembra de la alubia mediante un pase cruzado de grada, quedando una cobertura del 30%. La secuencia de operaciones fue volteo del suelo, gradeo, siembra de centeno y gradeo para incorporar la cubierta.
- Siembra directa (SD) en la ESTIA, ya que se disponía de una franja de terreno en el cual se había practicado desde 2003 la siembra directa, con lo que este tratamiento se practicó sólo en la ESTIA.

Las precipitaciones de mayo de 2008 fueron abundantes, retrasando el enterrado del centeno, lo que supuso un crecimiento excesivo (por encima de 0,50 m) y precisó dos pases de grada de discos. Posteriormente, un día antes de la siembra, se aplicó un herbicida total de contacto, el glifosato (RoundUp, Monsanto, EE.UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante, con la finalidad de eliminar las plantas adventicias que pudieran afectar al cultivo, lo que es especialmente importante en la SD, pero también en el CC para impedir el rebrote del centeno recién enterrado.

Las labores realizadas para la preparación del lecho de siembra en LC y CC durante 2009 fueron similares a las del año anterior, aunque las condiciones de menores precipitaciones durante el mes de mayo permitieron enterrar antes el centeno, y la escasez de lluvias durante la primavera hicieron que su desarrollo fuese menor (0,30 m, en estado de encañado).

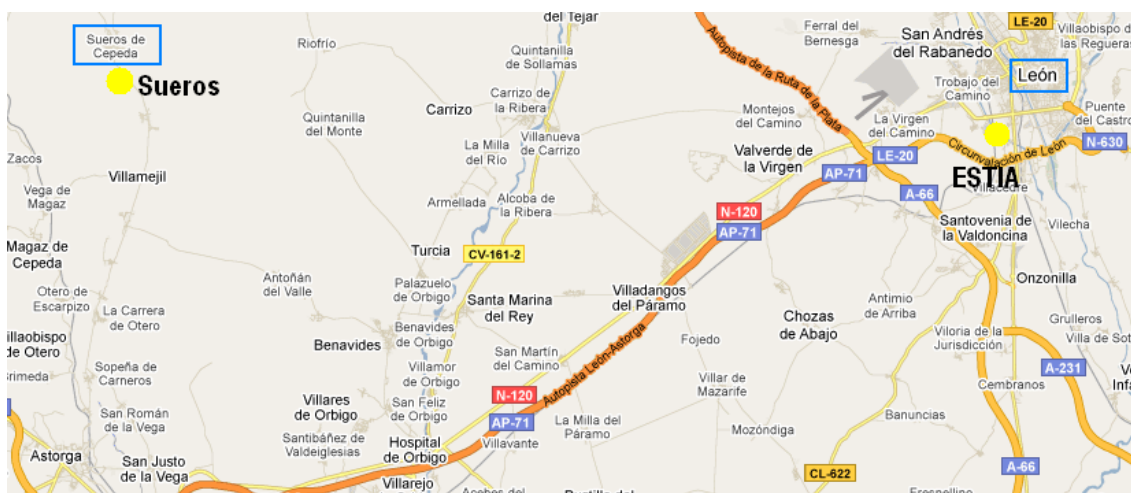


Figura 16. Mapa de localización de la ESTIA (León) y Sueros de Cepeda



Figura 17. Imagen de la localización de la parcela en la ESTIA (León)

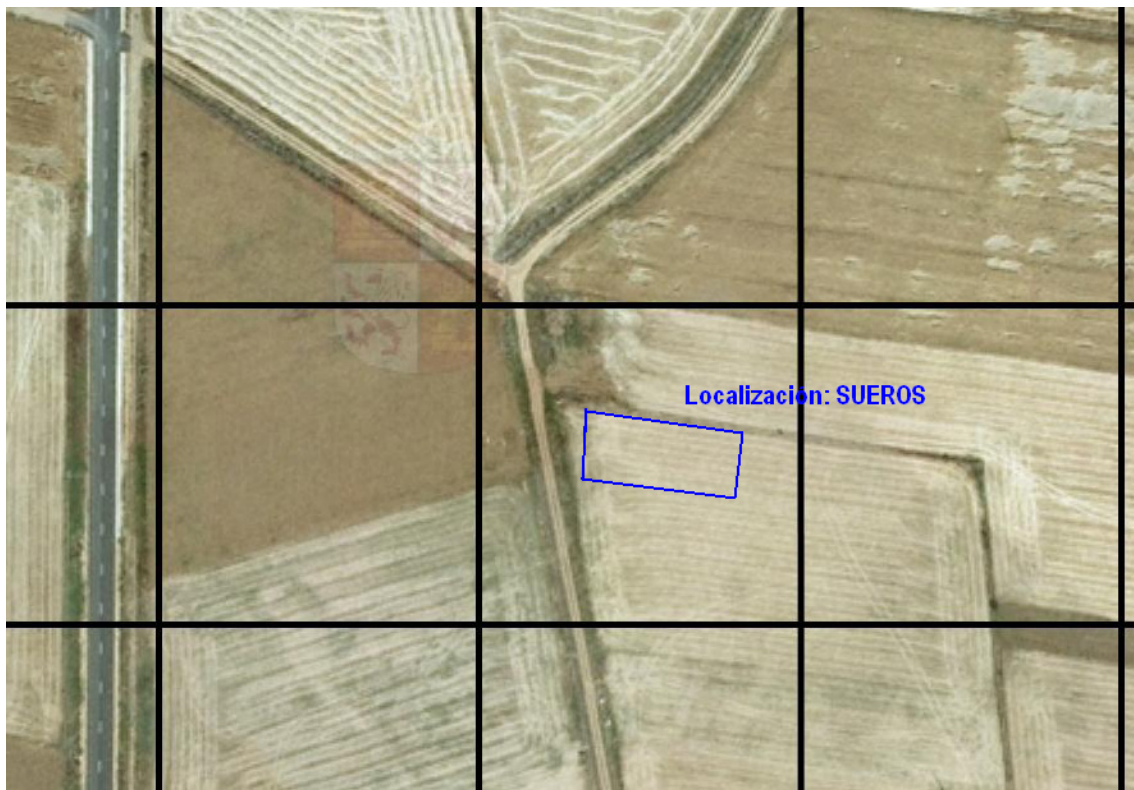


Figura 18. Imagen de la localización de la parcela en Sueros de Cepeda (León)

Tratamiento: inoculación con rizobios de elevada eficiencia de fijación de N₂

Los tratamientos de inoculación fueron:

- Inoculación con rizobios seleccionados en microcosmos por su alta eficiencia de fijación de N₂, reflejada en el rendimiento de las plantas inoculadas. Para evaluar su potencial como inoculantes se realizó en la subparcela un abonado de fondo solamente con superfosfato de cal 16% y cloruro de potasio 37%, sin aporte de nitrógeno.
- Control sin N: control no inoculado sin fertilización nitrogenada, con el mismo tipo de fertilización que en las parcelas inoculadas.
- Control con N: control no inoculado fertilizado con nitrógeno en forma de nitrato amónico cálcico (NAC, con riqueza del 27%).

3.6.1.3. Disposición del experimento

El suelo disponible en siembra directa en la ESTIA fue una franja de 70 m de longitud orientada en la dirección noroeste-sudeste. Los laboreos CC y LC se establecieron en franjas paralelas a la SD. Los cultivos circundantes fueron lúpulo al noroeste del experimento, otros experimentos con alubia al suroeste, al sudeste del experimento existía un camino de acceso a la parcela y al nordeste del experimento hubo una zona sin cultivar mantenida como barbecho.

En Sueros, el experimento se diseñó de la misma forma que en la ESTIA pero sin el tratamiento de laboreo de SD. En este caso la dimensión más larga estuvo orientada en la dirección este-oeste. Al norte del experimento se localizó el límite de la parcela, al este y al sur se localizó el cultivo del resto de la parcela cedida para investigación y al oeste del experimento se encuentra un camino.

En Sueros no existía SD, por lo que dentro de cada bloque se distribuyeron al azar tanto la parcela principal (laboreos CC y LC) como la subparcela (tratamiento de inoculación) (figura 19). La figura 20 muestra en una imagen de satélite el experimento de campo en el ambiente ESTIA 2008.

Los tres sistemas de laboreo que se emplearon en la ESTIA, correspondientes a las tres franjas de terreno, se correspondieron con tres bloques, que no fueron sorteados por la limitación de la ubicación y forma de la franja de SD. Cada bloque se subdividió en tres partes, cada una de ellas correspondió a una parcela principal del experimento. A lo largo de las parcelas principales se establecieron al azar los cinco tratamientos de inoculación (subparcelas o parcelas elementales). Cada subparcela estuvo formada por 4 filas de plantas de 2,25 m de longitud separadas entre sí 0,50 m, en las cuales la separación entre

plantas fue de 0,15 m. Con ello, se cultivaron 64 plantas de alubia por cada repetición. La distancia entre las repeticiones fue de 2,25 m. La anchura de las franjas de cada tipo de laboreo fue de 5,00 m (figura 21).

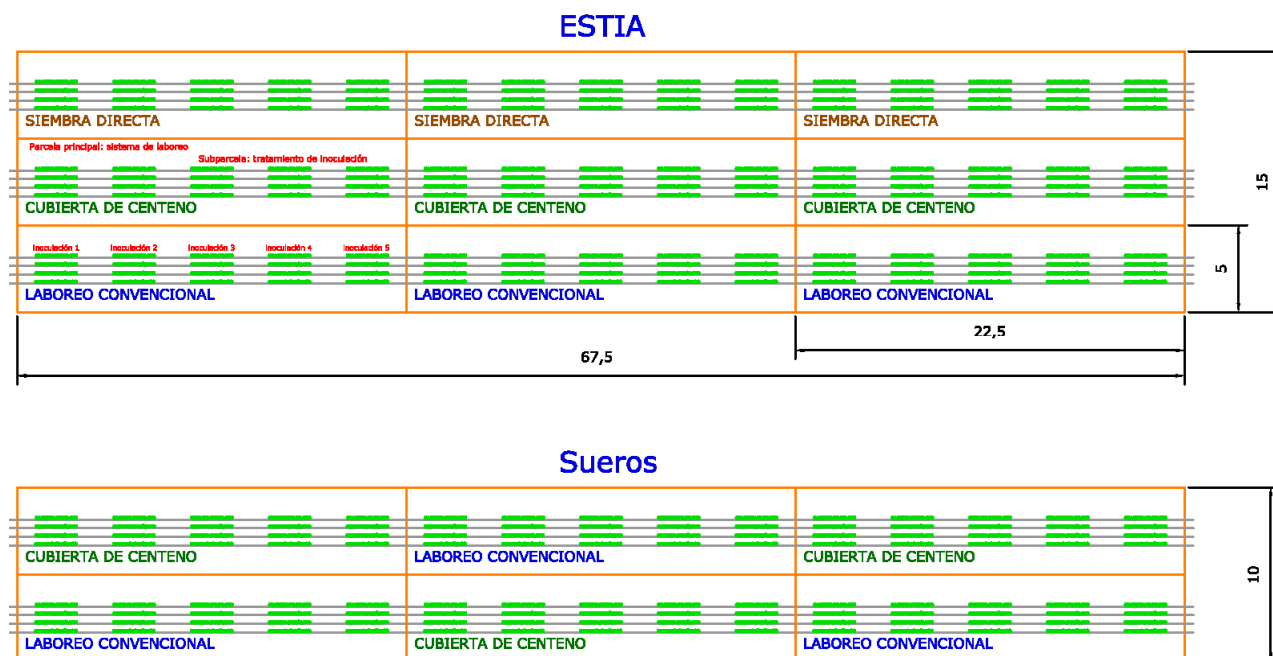


Figura 19. Disposición del experimento de campo en las localizaciones de sueros y ESTIA



Figura 20. Experimento de campo en la localización de ESTIA 2008

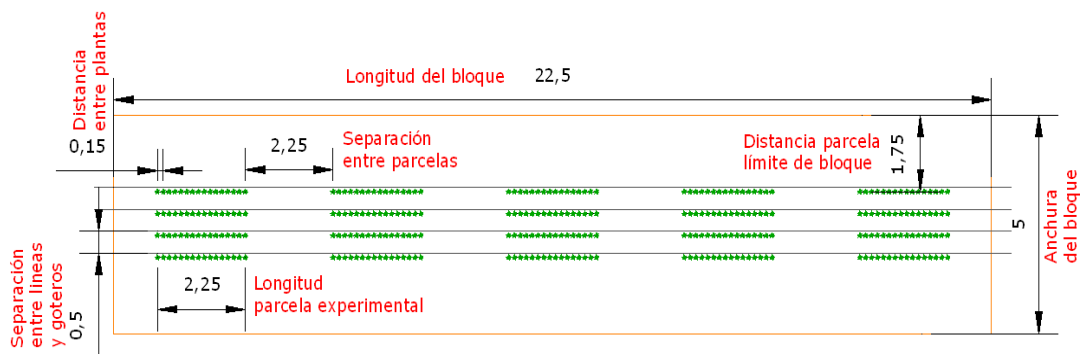


Figura 21. Dimensiones y disposición de la parcela principal (bloque) y subparcelas en el experimento de campo

3.6.2. Condiciones ambientales de los años 2008 y 2009

Las condiciones climatológicas de 2008 se caracterizaron por una primavera que registró una precipitación muy superior al promedio de 30 años en el observatorio de León (La Virgen del Camino), seguida de un verano seco (figura 22). En cuanto a los valores termométricos, la primavera se mantuvo con valores próximos a los promedios del período 1970-2001 del observatorio, pero los meses de julio y septiembre tuvieron una temperatura marcadamente inferior, tanto de temperaturas máximas como de mínimas (figura 23).

En 2009, la primavera se caracterizó por unas condiciones de precipitación inferiores a los valores promedio y a temperaturas ligeramente superiores, con lo que se puede calificar de una primavera seca y cálida. El verano también se mantuvo seco, pero con un mes de julio frío y unos meses de agosto y septiembre más cálidos que los valores promedio.

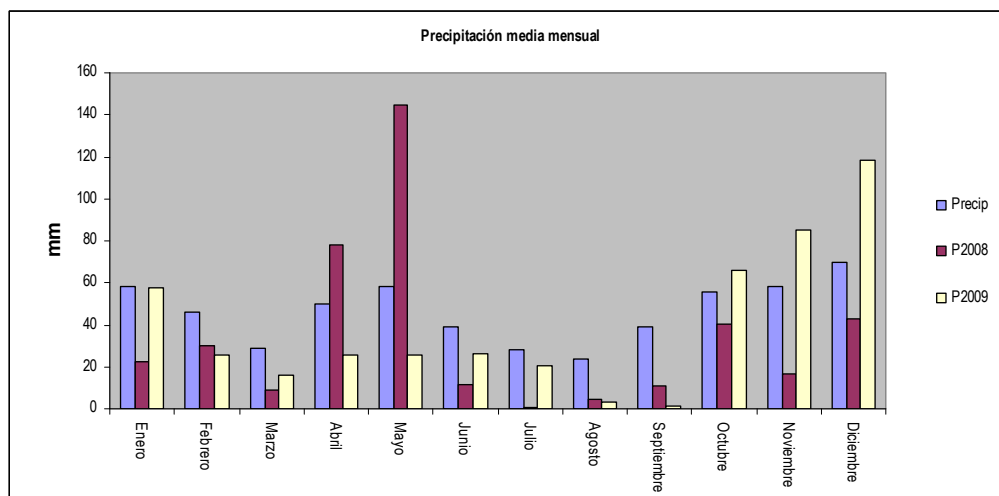


Figura 22. Precipitación media en el observatorio de León en el período 1970-2001 (Precip) y precipitaciones mensuales en 2008 y 2009 (P 2008 y P 2009)

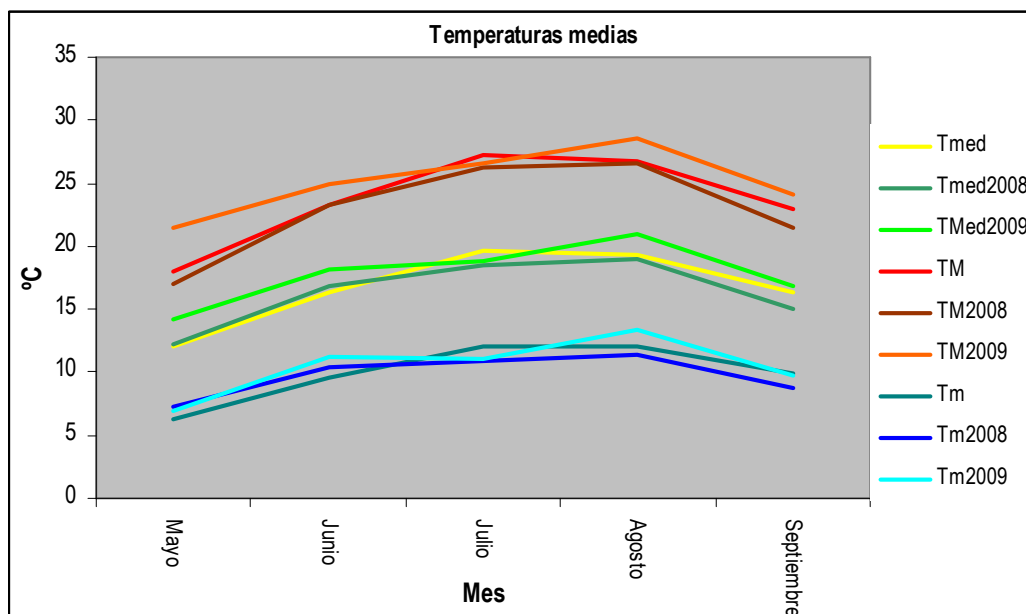


Figura 23. Temperaturas medias de los meses de mayo a septiembre 2008 y 2009 y del periodo 1970-2001 (T med, TM y Tm) en el observatorio de León

Las temperaturas máximas y mínimas durante el cultivo de la alubia en el experimento de campo (figura 24) evolucionaron de forma diferente en 2008 y en 2009. La primera quincena de junio de 2008 se mantuvo con temperaturas bajas o muy bajas, lo que se repitió de nuevo en la primera quincena del mes de julio y en parte del mes de agosto, con lo que puede calificarse de un verano frío, con días en los que la temperatura nocturna fue de alrededor de 5 °C, y muchos días sin sobrepasar los 25 °C. El año 2009 tuvo temperaturas más elevadas en el mes de junio por lo general, y lo más destacable fueron las temperaturas mínimas generalmente más elevadas que en 2008. El mes de julio presentó también un carácter relativamente frío, pero las temperaturas mínimas alrededor de 5 °C sólo se dieron un día. El mes de agosto fue sensiblemente más cálido en 2009.

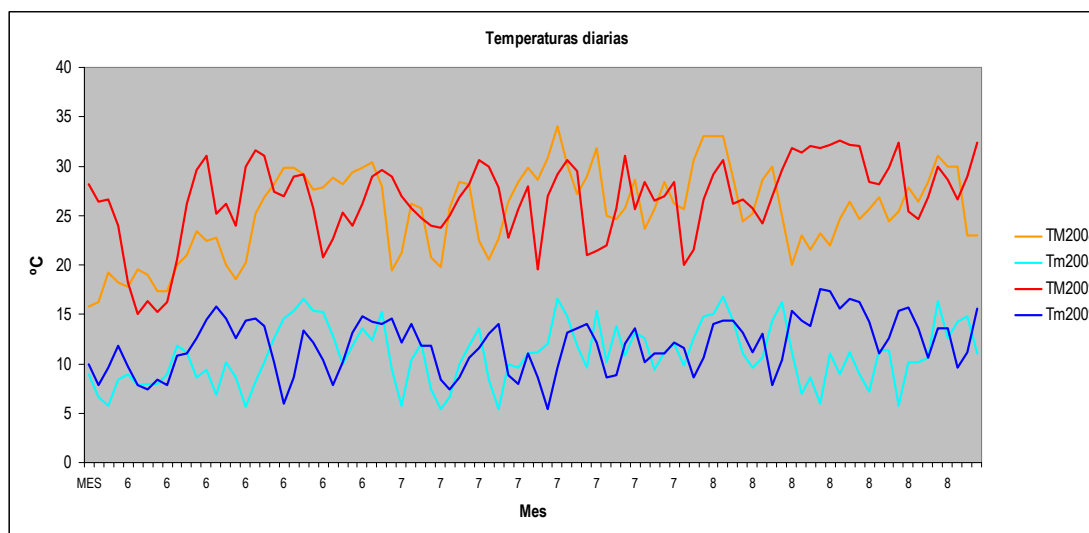


Figura 24. Temperaturas máximas y mínimas diarias durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 y 2009 en el observatorio de León

El apartado 3.5.2. presenta los análisis de los suelos llevados a cabo por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. La fertilización calculada a partir de los datos de esos análisis de suelos para el microcosmos fue aplicada en el experimento de campo, empleando los abonos NAC (27% N), superfosfato simple de cal (16% P_2O_5) y cloruro potásico (37% K_2O). Las cantidades aplicadas fueron las calculadas para el experimento en microcosmos por el número de plantas por repetición (64 plantas). El NAC se aplicó solamente en el control con N.

En el suelo de la ESTIA, el cultivo de la campaña anterior (2006-2007) fue colza (*Brassica oleracea* L.), que no había recibido fertilización para eliminar en lo posible en N remanente en el suelo. La ubicación de Sueros el cultivo de la campaña previa fue patata.

3.6.3. Actividades del experimento de campo

3.6.3.1. Preparación del suelo para la siembra

La preparación del lecho de siembra fue similar en Sueros de Cepeda y en la ESTIA, siguiendo el cronograma:

1. En el otoño se realizó un pase de arado de vertedera en los suelos correspondientes a los tratamientos de LC y CC. El área de SD no fue objeto de ningún laboreo.
2. A principios de febrero se llevó a cabo el gradeo de LC y CC con una grada de discos, seguido de un segundo gradeo en las parcelas de CC para preparar la siembra del centeno.
3. La siembra de centeno se realizó manualmente a mediados de febrero, a una dosis equivalente a 150 kg ha^{-1} de semilla, con el fin de obtener una elevada densidad de plantas.
4. A mediados de mayo estaba previsto el enterrado del centeno mediante dos pases cruzados de grada, pero en 2008 se retrasó el segundo pase hasta el 12 de junio por el exceso de humedad en el suelo.
5. La siembra de la alubia fue el 28 de mayo de 2009 y el 25 de junio de 2008.

3.6.3.2. Siembra e inoculación

Las semillas fueron depositadas secas en la cavidad de 4 cm de profundidad en el suelo (depositándose dos semillas en cada cavidad). La inoculación se realizó mediante vermiculita exfoliada esterilizada y empapada de cultivo líquido de los aislados en el medio

de cultivo YMB con una concentración celular superior a 10^9 UFC mL⁻¹. El volumen de vermiculita colocada como inoculante fue de aproximadamente 5 mL, que se colocó junto con las semillas en la misma cavidad.

Posteriormente, tras la emergencia, se retiraron aquellas plántulas en exceso para dejar el número final de 16 plantas por fila.

3.6.3.3. Sistema de riego, dosis y frecuencia

Para evitar la deriva del inóculo entre las subparcelas con distinto tratamiento de inoculación se implantó un sistema de riego por goteo. La tubería portagoteros de 16 mm de diámetro contenía goteros separados 0,20 m entre ellos (RainBird, EE.UU.). La frecuencia y el tiempo de riego fueron variables, realizándose cuando se había consumido el 50% del agua útil con el objeto de alcanzar la capacidad de campo, lo que fue comprobado mediante un medidor de humedad del suelo Fieldscout (Spectrum Technologies Inc., EE.UU.), en función de las temperaturas y del estado de desarrollo del cultivo. El calendario de riegos se muestra en el cronograma de las actividades del apartado 3.6.3.5.

3.6.3.4. Tratamientos fitosanitarios y control de plantas adventicias

Además, durante el cultivo en los dos años hubo que realizar un tratamiento contra mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) mediante la aplicación del insecticida imidacloprid (Confidor, Bayer, España) según las indicaciones del fabricante.

La eliminación de plantas adventicias se realizó mediante un herbicida total (glifosato 36% RoundUp, Monsanto, EE.UU.) entre subparcelas y en los pasillos, mientras que se realizaron dos escardas manuales a lo largo del cultivo.

3.6.3.5. Resumen de actividades del experimento de campo

La tabla 19 muestra las actividades llevadas a cabo en el experimento de 2008 en la ESTIA y la tabla 20 las actividades de los experimentos de Sueros y de la ESTIA durante 2009.

3.6.4. Toma y análisis de los datos

La recogida de las plantas se realizó en la primera quincena de octubre de 2008 y en la segunda quincena de septiembre de 2009, una vez que culminó el llenado de la semilla. Se recogieron diez plantas aleatoriamente dentro de cada parcela elemental, de sus dos líneas

centrales y sin tomar las cuatro plantas de los extremos de dichas líneas para evitar el efecto de borde. En esas plantas se determinó la biomasa aérea, número de vainas, número y peso de semillas y se analizó el contenido de N (Kjeldahl) en la semilla. Además, se recogieron todas las restantes plantas de las parcelas experimentales con el fin de obtener de ellas toda su producción de semillas.

Las variables dependientes analizadas fueron la biomasa de la parte aérea (g), el rendimiento (g planta^{-1}) el índice de cosecha (IC), y los componentes del rendimiento: el número de vainas por planta, el número de semillas por vaina y el peso de 1000 semillas (g). Además se analizó el nitrógeno total en las semillas (mg planta^{-1}). El IC resultó de la división del peso de las semillas por la biomasa aérea total de cada planta. Las variables independientes consideradas fueron el ambiente (combinación de año y suelo), los tratamientos del sistema de laboreo y de inoculación. Los ambientes fueron ESTIA 2008, ESTIA 2009 y Sueros 2009. Los tratamientos de sistema de laboreo fueron la siembra directa (SD), el laboreo convencional (LC) y el laboreo convencional con cubierta de centeno semienterrada (CC). Los tratamientos de inoculación fueron los tres rizobios seleccionados a partir del análisis de la eficiencia de fijación de N_2 en el microcosmos de 2007.

Los datos se sometieron a un ANOVA y posteriormente a una comparación de valores medios de cada una de las variables dependientes mediante el paquete informático SPSS Statistics 17 (SPSS Inc., EE.UU.).

Tabla 19. Actividades del experimento de campo en el ambiente ESTIA 2008

2008						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
19 MAYO	20	21	22	23	24	25
			Gradoo I de preparación del terreno (LC y CE)			
26	27	28	29	30	31 MAYO	1 JUNIO
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
			Gradoo II de preparación del terreno (LC y CE)			
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
		Siembra e inoculación	Riego 1			
30 JUNIO	1 JULIO	2	3	4	5	6
	Riego 2		Riego 3			
7	8	9	10	11	12	13
	Riego 4	Resiembra				
14	15	16	17	18	19	20
	Riego 5	Riego 5				
21	22	23	24	25	26	27
Escarda manual 1	Riego 6	Herbicida entre parcelas		Riego 7		
28	29	30	31 JULIO	1 AGOSTO	2	3
	Riego 8	Escarda manual 2	Escarda manual 2	Riego 9		
4	5	6	7	8	9	10
Riego 10			Riego 11			
11	12	13	14	15	16	17
			Riego 12 y conteo de malas hierbas 1			
18	19	20	21	22	23	24
Riego 13			Riego 14 y escarda manual 3	Escarda manual 3		
25	26	27	28	29	30	31 AGOSTO
Riego 15			Riego 16	Conteo de malas hierbas 2		
1 SEPTIEMBRE	2	3	4	5	6	7
Riego 17			Riego 18			
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	1 OCTUBRE	2	3	4	5 OCTUBRE
Inicio recogida de plantas						

Tabla 20. Actividades del experimento de campo en los ambientes ESTIA - Sueros 2009

2009						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
11 MAYO	12	13	14	15	16	17
			ESTIA: Gradoo I de preparación (LC y CE)			
18	19	20	21	22	23	24
		SUEROS: Gradoo de preparación		ESTIA: Gradoo II de preparación (LC y CE)		
25	26	27	28	29	30	31 MAYO
	SUEROS y ESTIA: riego 1 de preparación de terreno		SUEROS y ESTIA: siembra e inoculación			
1 JUNIO	2	3	4	5	6	7
ESTIA: fertilización N, P y K ESTIA: riego 2	SUEROS: fertilización N	SUEROS: riego 2				
8	9	10	11	12	13	14
			ESTIA: resiembra	SUEROS: resiembra		
15	16	17	18	19	20	21
		ESTIA: riego 3		SUEROS: aporcado		
22	23	24	25	26	27	28
SUEROS: herbicida entre parcelas	ESTIA: riego 4 SUEROS: riego 3		ESTIA: herbicida entre parcelas			
29	30 JUNIO	1 JULIO	2	3	4	5
			ESTIA: riego 5			
6	7	8	9	10	11	12
SUEROS: riego 4		ESTIA: riego 6				
13	14	15	16	17	18	19
SUEROS: riego 5	ESTIA: riego 7					
20	21	22	23	24	25	26
ESTIA: riego 8 SUEROS: riego 6						
27	28	29	30	31 JULIO	1 AGOSTO	2
		SUEROS: riego 7				
3	4	5	6	7	8	9
ESTIA: riego 9		SUEROS: riego 8				
10	11	12	13	14	15	16
	ESTIA: riego 10	SUEROS: riego 9	SUEROS: contaje malas hierbas	ESTIA y SUEROS: tratamiento acaricida		
17	18	19	20	21	22	23
		ESTIA: riego 11	SUEROS: riego 10			
24	25	26	27	28	29	30
	ESTIA: riego 12			SUEROS: riego 11		
31 AGOSTO	1 SEPTIEMBRE	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
	ESTIA: recogida de plantas					
14	15	16	17	18	19	20
SUEROS: recogida de plantas						

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de una colección de aislados bacterianos a partir de nódulos

El criterio de selección de parcelas de alubia en 2005 y 2006 para ser comercializada bajo el amparo de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León" (IGP) fue la representación de las comarcas agrarias incluidas en la IGP según su Reglamento (España, 2006). Las comarcas de Cabrera y Tierras de León quedaron sin representación en la colección de nódulos por la ausencia del cultivo en ellas (Mario Cordero Alija, comunicación personal), mientras que las comarcas leonesas del Páramo, Astorga, La Bañeza, Esla-Campos y la comarca zamorana de Benavente y los Valles fueron objeto de la recolección de nódulos.

En 2005 se obtuvieron nódulos de los suelos donde se cultivaba alubia del 1 al 12 y en 2006 en los suelos numerados del 14 al 20. La tabla 21 presenta el número de nódulos obtenidos de cada suelo, su origen y la representación comarcal. La figura 25 muestra la distribución de los suelos originarios de los nódulos sobre un mapa de las distintas comarcas agrarias y términos municipales amparados por la IGP. El historial de los cultivos de los suelos se presenta en la tabla 22.

A partir de los nódulos se obtuvieron 90 colonias de aspecto mucoso sobre placas de YMA (figura 26), lo que implica que sólo se consiguieron aislar cepas a partir del 42% de los 214 nódulos analizados. El mayor número de nódulos y de aislados provenía de las comarcas agrarias del Páramo y Esla-Campos y la que menos aislados aportó fue Benavente y los Valles. Aunque dentro de la IGP existen suelos con mayor tradición en el cultivo de la alubia que otros, en ninguno de los suelos originarios de los aislados se había cultivado alubia con una periodicidad elevada en los últimos años, como se observa en la tabla 22. Sin embargo, el número de nódulos recogidos en los diferentes suelos presenta cierta relación con la tradición en el cultivo, si se considera que la zona de mayor tradición en el entorno de La Bañeza y zonas próximas del Páramo y del valle del Tuerto.

De los aislados obtenidos, 57 aislados fueron incluidos en los estudios de caracterización y selección basada en su eficiencia de fijación de N_2 , ya que algunos de ellos fueron descartados al presentar características macro y microscópicas diferentes a los de los rizobios (designación de los aislados en la tabla 23).

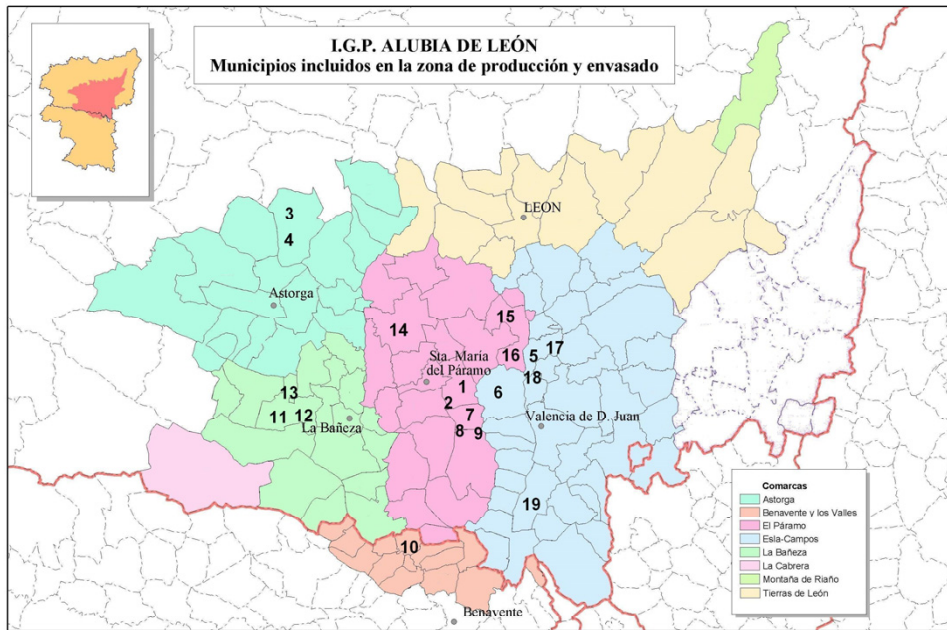


Figura 25. Mapa de la I.G.P. “Alubia de La Bañeza-León” sobre el cual se localiza el número de las parcelas visitadas

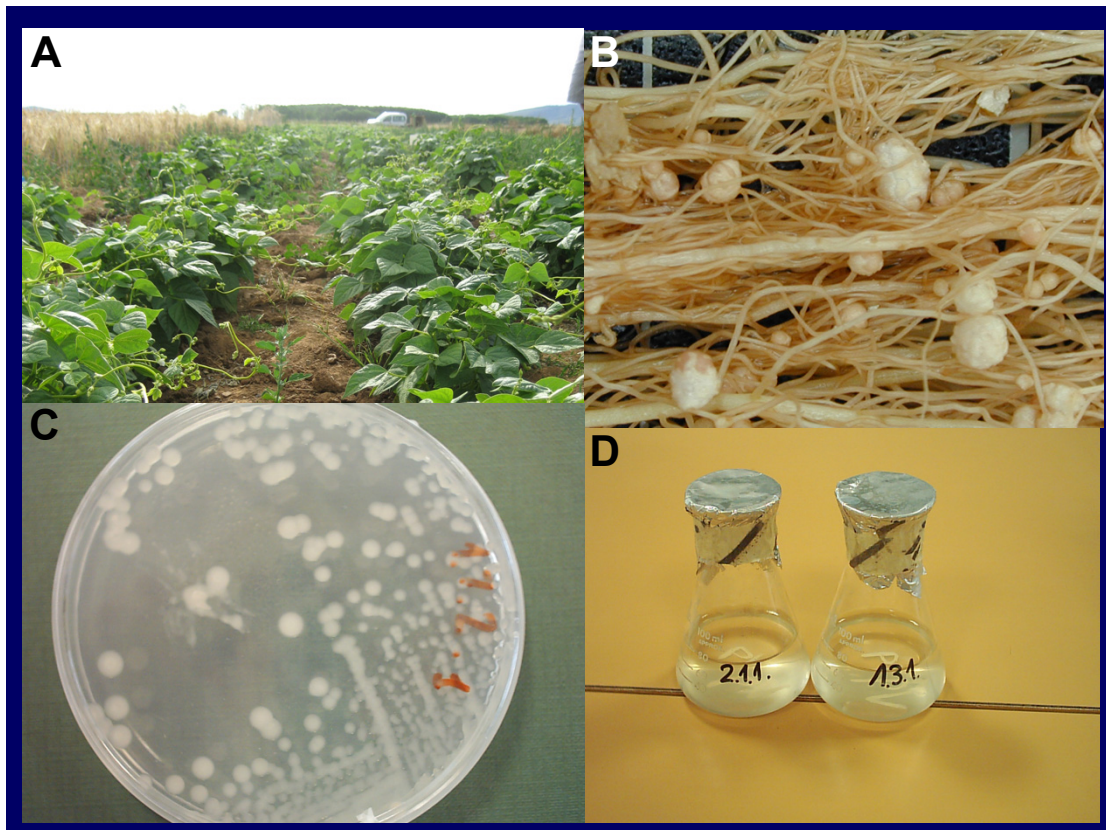


Figura 26. (A) campo de alubia en la IGP; (B) nódulos en raíz de alubia; (C) rizobio aislado en placa de YMA; (D) cultivo líquido de rizobio en caldo YMB

Tabla 21. Origen de los nódulos y aislados de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León"

Suelo	Comarca (Provincia)	Municipio	Localidad	Nº nódulos	Nº aislados
1	Páramo (León)	Bercianos del Páramo	Bercianos del Páramo	20	6
2	Páramo (León)	Bercianos del Páramo	Bercianos del Páramo	22	5
3	Astorga (León)	Villamejil	Sueros de Cepeda	15	7
4	Astorga (León)	Villamejil	Sueros de Cepeda	21	7
5	Esla – Campos (León)	Cabrerros del Río	Cabrerros del Río	1	0
6	Esla – Campos (León)	Villamañán	Villamañán	24	15
7	Páramo (León)	Pobladura de P. Gar.	Pobladura de P. Gar.	17	8
9	Páramo (León)	Pobladura de P. Gar.	Zuares del Páramo	23	7
10	Benavente y los Valles(Zamora)	Maire de Castroponce	Maire de Castroponce	10	5
11	La Bañeza (León)	Villamontán	Miñambres	3	3
12	La Bañeza (León)	Villamontán	Miñambres	13	6
14	Páramo (León)	Bustillo del Páramo	Antoñanes del Páramo	17	14
15	Esla – Campos (León)	Ardón	Villalobar	3	0
16	Esla – Campos (León)	Ardón	Villalobar	3	0
17	Esla – Campos (León)	Cabrerros del Río	Jabares de los Oteros	7	0
18	Esla – Campos (León)	Cabrerros del Río	Jabares de los Oteros	1	0
19	Esla – Campos (León)	Villaornate y Castro	Villaornate	13	7
20	Esla – Campos (León)	Villaornate y Castro	Villaornate	1	0
TOTAL Comarca del Páramo (León)				99	40
TOTAL Comarca de Astorga (León)				36	14
TOTAL Comarca de La Bañeza (León)				16	9
TOTAL Comarca de Esla – Campos (León)				53	22
TOTAL Comarca de Benavente y los Valles (Zamora)				10	5
TOTAL				214	90

Tabla 22. Historial de cultivo de los suelos de origen de los nódulos

Suelo	Referencias del agricultor anotadas en la visita	Detalles del historial del cultivo
1	El productor conoce el historial del cultivo de los últimos cuatro años e intuye lo que pudo haber pasado en los 20 años anteriores. En los últimos cuatro años no se cultivó alubia y en los 20 años anteriores es probable que 2 o 3 veces	No hay datos
2	Durante 25 años, en los 20 primeros años nunca se cultivó alubia, sin embargo en los 5 últimos años se cultivó 2 veces	2001: Alubia 2002: otro cultivo 2003: Alubia 2004: otro cultivo 2005: Alubia
3	El agricultor conoce el historial del suelo en los últimos 5 años, y muchos más en los que intuye la dedicación de la parcela, sin alubia hasta 2005	2001 - 2003: Cereal 2004: Remolacha 2005: Alubia
4	No hay datos	No hay datos
6	No hay datos	No hay datos
7	Durante 20 años se ha sembrado alubia en rotación 1 de cada 6 años	2004: Maíz 2005: Alubia
9	Se conoce su dedicación desde hace más de 30 años y se cultivó alubia un promedio de un año de cada 3 años	No hay datos
10	Se conoce la dedicación de la parcela desde hace 3 años, antes tuvo otro propietario y no hay posibilidad de conocerlo	2002 - 2004: Maíz 2005: Alubia
11/12	Documentado desde hace 10 años	Cebada (varios años) Pradera (varios años) 1998: Patata 1999: No hay datos 2000: Remolacha 2001: Trigo 2002: Patata 2003: Cebada 2004: Trigo 2005: Alubia
14	No se cultivó alubia durante los últimos ocho años	No hay datos
19	Hasta 1990 se cultivó alubia un año de cada 3 o 4 años, en rotación con cereal. Desde 1990 no hubo alubia nunca hasta 2006.	2000 - 2004: Maíz 2005: Remolacha 2006: Alubia

Tabla 23. Origen y codificación de los aislados bacterianos

Provincia	Comarca	Localidad (municipio)	Suelo	Nombre de la cepa		
León	Páramo	Bustillo del Páramo	01	LBM0101		
				LBM0108		
				LBM0111		
				LBM0114		
			02			LBM0201
						LBM0205
						LBM0209
						LBM0211
		Pobladura Pelayo García	07			LBM0212
						LPP0703
						LPP0704
						LPP0708
						LPP0715
						LPA1401
	Antoñanes del Páramo (Bustillo del Páramo)	14			LPA1403	
					LPA1405	
					LPA1410	
					LPA1413	
					LPA1414	
					LPA1425	
					LPA1417	
	La Bañeza	Miñambres de Valduerna (Villamontán)		11	LBM1101	
					LBM1102	
LBM1113						
LBM1123						
			12	LBM1209		
				LBM1210		
				LBM1212		
Villaornate (Villaornate y Castro)			19	LET1901		
				LET1912		
				LET1913		
Esla-Campos	Villamañán		06	LEV0601		
				LEV0602		
				LEV0603		
				LEV0605		
				LEV0607		
				LEV0609		
				LEV0612		
				LEV0613		
				LEV0614		
LEV0615						
Cepeda*	Sueros de Cepeda (Villamejil)		03	LCS0303		
				LCS0305		
				LCS0306		
				LCS0308		
				LCS0313		
			04	LCS0401		
				LCS0403		
				LCS0404		
				LCS0407		
				LCS0408		
LCS0411						
Zamora	Benavente	Maire de Castroponce	10	ZBM1005		
				ZBM1007		
				ZBM1008		

4.2. Caracterización molecular

4.2.1. 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.*, 2002). Por ello, este método permite agrupar los aislados de una población y seleccionar un representante de cada grupo con la finalidad de secuenciar los genes necesarios para su identificación y para el estudio de 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.*, 2002). Concretamente se han utilizado para agrupar y seleccionar cepas aisladas a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* en España (García-Fraile *et al.*, 2010).

Los resultados del análisis de los perfiles de TP-RAPD se muestran en la figura 27 y en la tabla 24. Se obtuvieron 14 perfiles diferentes, de los cuáles tres (perfiles XII, XIII y XIV, de los aislados LCS0308, LCS0313 y LBM1210), fueron presentados por un único aislado. El perfil I incluyó 18 aislados, seguido del perfil VI, con diez aislados. El perfil II y el V fueron presentados por cinco cepas cada uno, el perfil VII por cuatro cepas, el perfil X por tres cepas. Cada uno de los perfiles III, IV, VIII, IX y XI incluyó dos aislados.

Teniendo en cuenta que los perfiles de TP-RAPD permiten agrupar aislados bacterianos a nivel de especie y/o subespecie, de acuerdo con los resultados obtenidos, las cepas de rizobio aislados a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* en este estudio pertenecen a 14 taxones diferentes. Para la identificación de dichos taxones, se seleccionó una cepa representativa de cada perfil, que será posteriormente sometida a la secuenciación de los fragmentos de su ADN propuestos.

Los aislados con los perfiles III y VIII de TP-RAPD no fueron identificados, ya que no presentaron capacidad infectiva en las condiciones hidropónicas posteriormente.

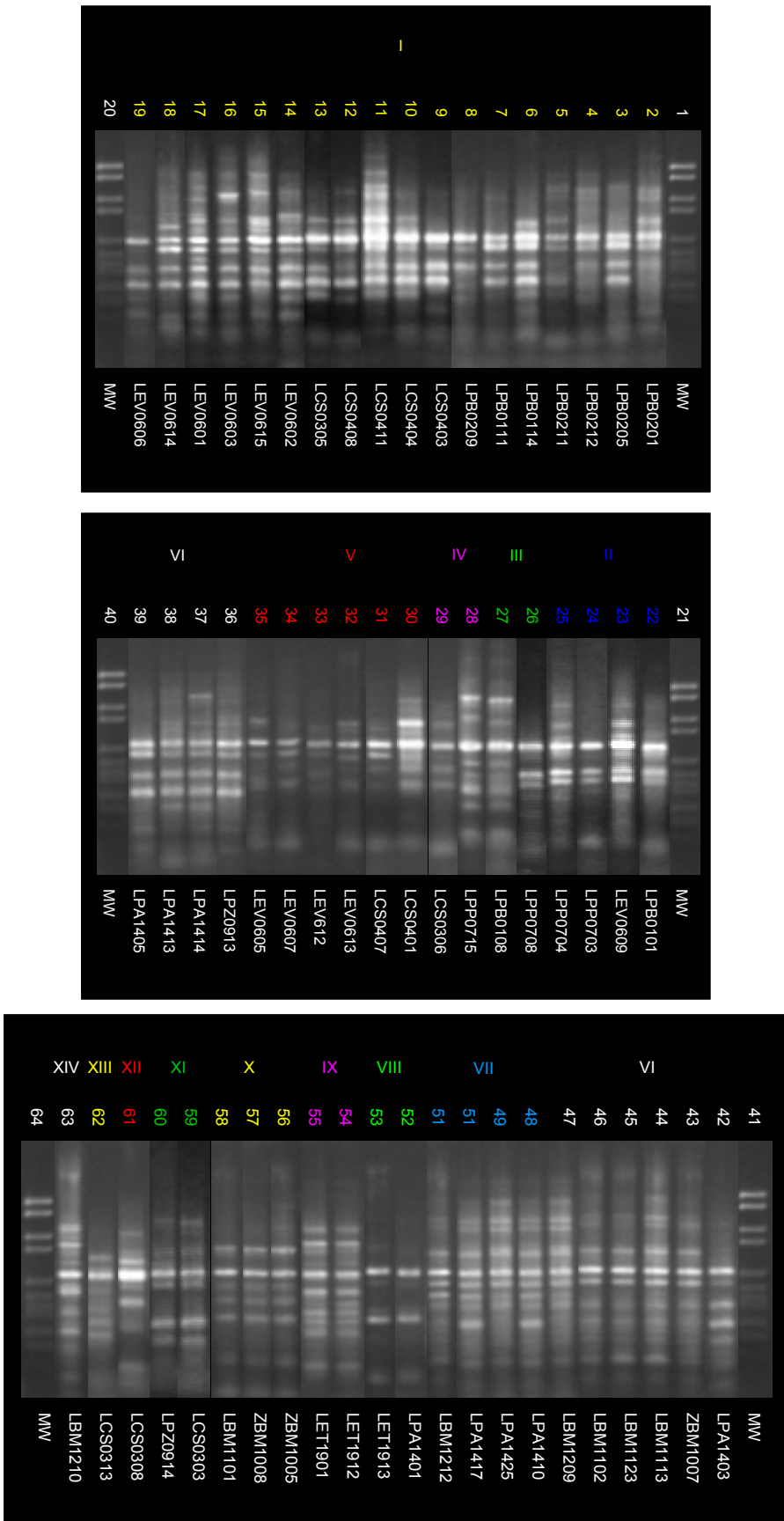


Figura 27. Perfiles de TP-RAPD de los aislados de este estudio. MW: Marcador de pesos moleculares VI de Roche (carriles 1, 20, 21, 40, 41 y 64) (carriles 2-19, 22-38 y 42-63: aislados bacterianos de este estudio)

Tabla 24. Perfiles de TP-RAPD de los aislados de este estudio (en negrita los aislados elegidos para la secuenciación de ADN)

Perfil	Aislados	Origen: localidad (nº de suelo)
I	LPB0111, LPB0114	Bustillo del Páramo (1)
	LPB0201, LPB0205 , LPB0209, LPB0211, LPB0212	Bustillo del Páramo (2)
	LCS0305	Sueros de Cepeda (3)
	LCS0403, LCS0404, LCS0411, LCS0408	Sueros de Cepeda (4)
	LEV0601, LEV0602, LEV0603, LEV0606, LEV0614, LEV0615	Villamañán (6)
II	LPB0101	Bustillo del Páramo (1)
	LEV0609	Villamañán (6)
	LPP0703, LPP0704, LPP0708	Pobladura P García (7)
III	LPB0108	Bustillo del Páramo (1)
	LPP0715	Pobladura P García (7)
IV	LCS0306	Sueros de Cepeda (3)
	LCS0401	Sueros de Cepeda (4)
V	LCS0407	Sueros de Cepeda (4)
	LEV0605, LEV0607, LEV0612, LEV0613	Villamañán (6)
VI	LPZ0913	Zuares del Páramo (9)
	LPA1403, LPA1405, LPA1413, LPA1414	Antoñanes del Páramo (14)
	ZBM1007	Maire de Castroponce (10)
	LBM1113, LBM1123, LBM1102	Miñambres de la Valduerna (11)
	LBM1209	Miñambres de la Valduerna (12)
VII	LPA1410 , LPA1425, LPA1417	Antoñanes del Páramo (14)
	LBM1212	Miñambres de la Valduerna (12)
VIII	LPA1401	Antoñanes del Páramo (14)
	LET1913	Villaornate (19)
IX	LET1901, LET1912	Villaornate (19)
X	ZBM1005 , ZBM1008	Maire de Castroponce (10)
	LBM1101	Miñambres de la Valduerna (11)
XI	LCS0303	Sueros de Cepeda (3)
	LPZ0914	Zuares del Páramo (9)
XII	LCS0308	Sueros de Cepeda (3)
XIII	LCS0313	Sueros de Cepeda (3)
XIV	LBM1210	Miñambres de la Valduerna (12)

En la representación sobre el mapa de la IGP del número de aislados por grupo (figura 28) se observa que la mayoría de los grupos de aislados con el mismo perfil (excepto los grupos III, IV y IX) incluyeron aislados de diferentes comarcas. El perfil III incluye dos aislados del Páramo, el grupo IV incluye dos aislados de Cepeda y el grupo IX incluye dos aislados del Valle del Esla.

Los resultados del análisis de TP-RAPD muestran la elevada diversidad genética de los rizobios que nodulan alubia en Castilla y León comparable a la obtenida en otras regiones españolas utilizando RFLP del gen ribosómico 16S (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). No obstante, la medida de la diversidad genética entre ambas técnicas no es comparable ya que los perfiles de RFLP del gen ribosómico 16S no permiten diferenciar ni siquiera entre especies próximas y los TP-RAPD permiten diferenciar incluso entre subespecies de la misma especie (Rivas *et al.*, 2002).

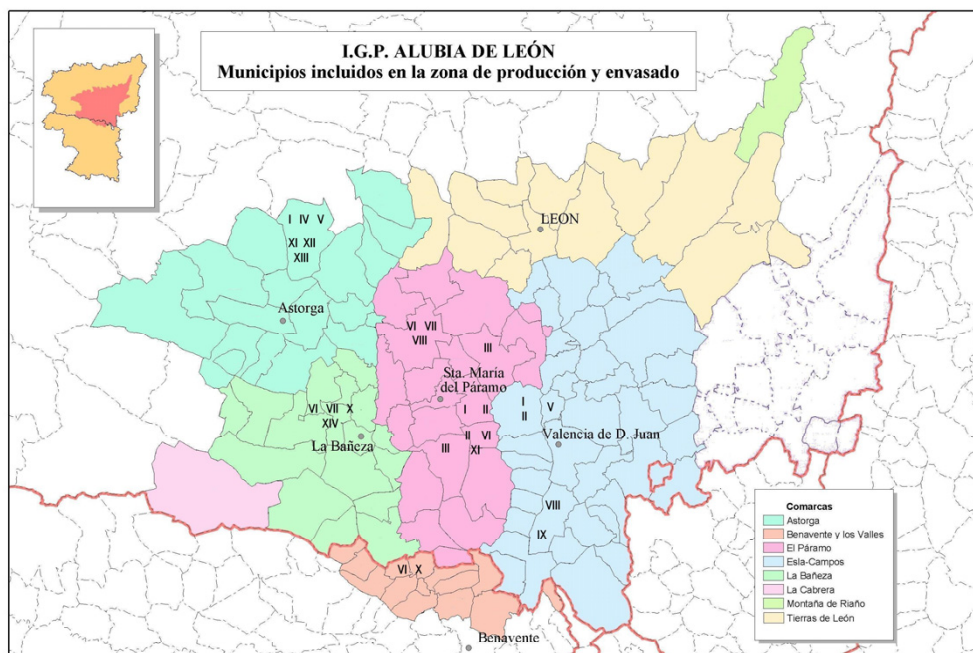


Figura 28. Mapa de la IGP con los perfiles de TP-RAPD

4.2.2. Secuenciación y análisis filogenético de genes cromosómicos

4.2.2.1. Secuenciación y análisis del gen ribosómico 16S

El gen ribosómico 16S es actualmente la base de la clasificación de los procariontes y ha permitido definir entidades taxonómicas que van desde el Phylum hasta la especie. Los rizobios se han clasificado en varias familias y géneros en base a la secuencia de este gen hallándose actualmente englobados todos los rizobios de crecimiento rápido en la familia *Rhizobiaceae* (Kuykendall, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, para llevar a cabo el análisis del gen ribosómico 16S se seleccionó una cepa representativa de cada grupo de TP-RAPD. Los resultados obtenidos muestran que todos los aislados de este estudio pertenecen al género *Rhizobium*. Los aislados que presentaron los perfiles I, II, IV, V, VI, VII, X, XI, XII, XIII y XIV presentaron idéntica secuencia del gen ribosómico 16S, por lo que sólo se presentan en el árbol filogenético de la figura 29 y en la tabla 25 de porcentajes de identidad aquellos aislados procedentes de diferentes suelos. La secuencia de estos aislados presentó 100% de identidad con la de la cepa tipo de *R. leguminosarum* USDA 2370^T. Los dos aislados del perfil IX presentaron 100% de identidad con la secuencia del gen 16S de la cepa tipo de *R. giardinii* H152^T.

Estos resultados muestran una escasa diversidad en cuanto a las especies presentes en los suelos del noroeste de España, lo que contrasta con la encontrada en suelos andaluces, donde se han encontrado seis especies diferentes (Herrera-Cervera *et al.*, 1995; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). El hecho de que en este caso se tratara de suelos en los que no se había cultivado alubia sugiere una selección por parte de la planta de las especies de rizobios en aquellos suelos en los que el cultivo es más frecuente y al mismo tiempo una mala adaptación de algunas especies de rizobios a las condiciones ambientales del norte de la Península Ibérica (García-Fraile *et al.*, 2010).

La total identidad en el gen 16S de las cepas aisladas a partir de nódulos de alubia en el noroeste de España y la cepa USDA 2370^T es una característica frecuente en cepas aisladas de otros hospedadores como *Vicia* o *Trifolium*, que también pueden nodular alubia (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009). Esto no implica que las cepas sean idénticas entre sí, ni siquiera que pertenezcan a la misma especie ya que el gen ribosómico 16S no permite la diferenciación de especies próximas del género *Rhizobium* (Valverde *et al.*, 2006; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008). Por lo tanto, para la identificación de los aislados de este género es necesario utilizar otros marcadores filogenéticos como los genes *housekeeping* o los fragmentos intergénicos situados entre los genes ribosómicos 16S y 23S que, debido a presentar un menor grado de conservación, son más útiles para diferenciar entre taxones muy próximos filogenéticamente (Gaunt *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2005).

4.2.2.2. Secuenciación y análisis de los genes *recA* y *atpD*

Los genes *housekeeping* codifican proteínas que juegan un papel crucial en el ciclo celular de las bacterias y desde hace unos años se ha generalizado la utilización de sus secuencias como herramientas taxonómicas sobre todo para la diferenciación de especies del mismo género (Stackebrandt *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la secuenciación de cinco genes pueden sustituir incluso a la hibridación del DNA total o incluso un número menor en tanto su elección sea la adecuada (Zeigler, 2003). En el caso de la familia *Rhizobiaceae* se han propuesto los genes *recA* y *atpD* como marcadores taxonómicos (Gaunt *et al.*, 2001). El gen *recA* codifica para parte del sistema de recombinación y reparación de ADN y existen numerosos estudios filogenéticos de diferentes grupos de bacterias basadas en su secuencia que muestran una buena correlación con los obtenidos de acuerdo con las secuencias del gen ribosómico 16S (Eisen, 1995; Lloyd & Sharp, 1993; Marechal *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2004).

El gen *atpD* codifica para la subunidad β de la ATP-sintetasa de membrana, que es esencial para la producción de energía. También se ha utilizado en diversos grupos de procariotas

para el estudio de sus relaciones filogenéticas comparándolas con las inferidas a partir del gen ribosómico 16S (Christensen & Olsen, 1998; Petersen *et al.*, 2001).

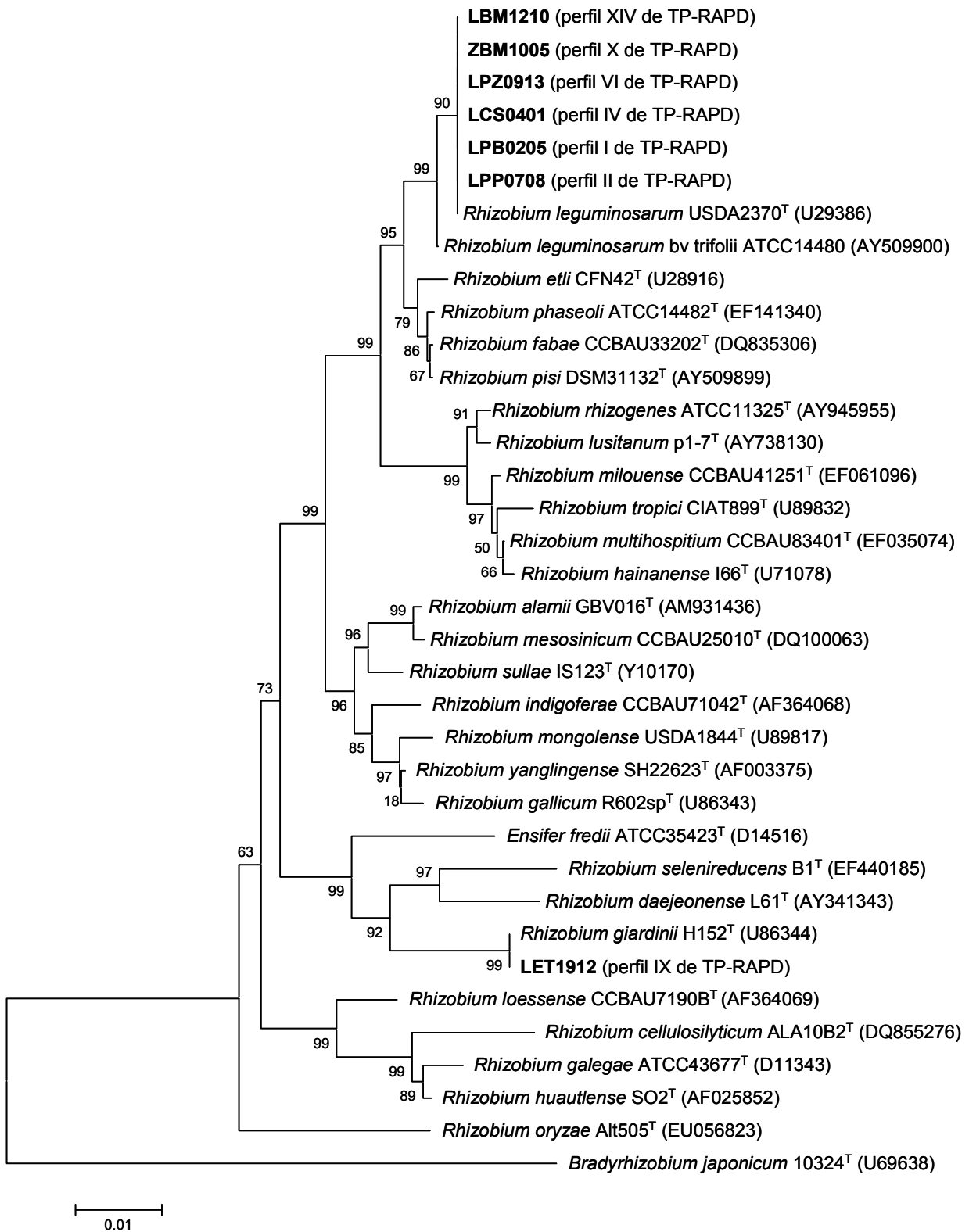


Figura 29. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados y diferentes especies de los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* y *Bradyrhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas

Tabla 25. Porcentajes de identidad del gen ribosómico 16S de distintas cepas de referencia con los aislados

	<i>R. sullae</i>	<i>R. alarii</i>	<i>R. gallicum</i>	<i>R. mongole</i>	<i>R. indigoferae</i>	ZBM1005	LBM1210	LPZ0913	LCS0401	LPP0708	LPB0205	<i>R. leguminosarum</i> bv trifolii	<i>R. fabae</i>	<i>R. pisi</i>	<i>R. phaseoli</i>	<i>R. etli</i>	<i>R. tropici</i>	<i>R. lusitanum</i>	<i>R. giardinii</i>	LET1912	<i>E. fredii</i>	<i>R. cellulosyllicum</i>	<i>R. galegae</i>	<i>R. orizae</i>	<i>B. japonicum</i>	
<i>R. sullae</i>	---																									
<i>R. alarii</i>	98,7	---																								
<i>R. gallicum</i>	95,4	98,4	---																							
<i>R. mongolense</i>	97,0	98,3	99,4	---																						
<i>R. indigoferae</i>	97,1	98,3	98,9	98,7	---																					
ZBM1005	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	---																				
LBM1210	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	100	---																			
LPZ0913	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	100	100	---																		
LCS0401	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	100	100	100	---																	
LPP0708	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	100	100	100	100	---																
LPB0205	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	100	100	100	100	100	---															
<i>R. leguminosarum</i>	96,2	97,7	97,5	97,5	97,7	100	100	100	100	100	100	---														
<i>R. leguminosarum</i> bv trifolii	94,9	97,9	97,7	97,6	98,0	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	---													
<i>R. fabae</i>	98,7	98,4	98,1	98,0	98,2	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,3	---												
<i>R. pisi</i>	95,3	98,4	97,6	98,1	98,3	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	98,8	99,9	---											
<i>R. phaseoli</i>	95,3	98,4	97,6	98,1	98,3	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	98,7	99,9	99,8	---										
<i>R. etli</i>	94,7	98,0	98,1	98,2	97,9	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	99,5	99,5	99,2	---									
<i>R. tropici</i>	93,0	96,0	95,7	96,2	96,0	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,2	97,3	97,4	97,4	97,2	---								
<i>R. lusitanum</i>	93,4	96,3	96,2	96,5	96,4	98,0	98,0	98,0	98,0	98,0	98,0	98,0	97,6	97,7	97,9	97,8	97,8	98,9	---							
<i>R. giardinii</i>	91,7	95,2	95,7	95,4	95,0	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	96,0	95,4	95,2	95,2	95,6	95,3	95,9	---						
LET1912	91,7	95,2	95,7	95,4	95,0	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	96,0	95,4	95,2	95,2	95,6	95,3	95,9	100	---					
<i>E. fredii</i>	92,9	96,3	96,2	95,8	96,0	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,9	95,6	95,3	95,2	95,7	95,1	95,8	96,8	96,8	---				
<i>R. cellulosyl</i>	91,7	95,4	95,4	95,4	95,3	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,8	94,3	94,1	94,2	94,4	92,9	93,3	94,4	94,4	94,1	---		
<i>R. galegae</i>	92,9	96,4	96,9	96,7	96,2	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	96,0	95,5	95,5	95,4	95,6	94,4	94,9	95,9	95,9	95,9	95,1	98,0	---	
<i>R. orizae</i>	93,9	95,9	95,4	95,8	96,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,8	95,6	95,4	95,7	94,0	94,6	93,1	93,1	94,8	94,3	94,8	---	
<i>B. japonicum</i>	87,6	89,6	89,7	89,6	89,8	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	89,5	89,5	89,9	89,9	89,7	88,4	88,8	88,6	88,6	89,4	90,1	90,0	89,5	---

Ambos genes se han secuenciado en la mayoría de las especies de rizobios y se ha demostrado su utilidad en la clasificación e identificación de los mismos (Gaunt *et al.*, 2001; Santillana *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006; Vinuesa *et al.*, 2005). Ambos genes permiten la diferenciación de especies muy próximas filogenéticamente dentro del género *Rhizobium* (Valverde *et al.*, 2006; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) y también diferenciar grupos cuando el gen ribosómico es idéntico (Santillana *et al.*, 2006; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Alvarez-Martínez *et al.*, 2009). Por ello se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes *recA* y *atpD* de un aislado de cada perfil de TP-RAPD. Los porcentajes de identidad con cepas de referencia de *Rhizobium* se muestran en las tablas 26 y 27 y el análisis filogenético se representa con árboles filogenéticos en las figuras 30 y 31.

El análisis filogenético del gen *recA* mostró una agrupación sólida de los aislados en torno a *R. leguminosarum* a excepción del perfil IX, que presentó una similitud elevada con *R. giardinii* (98,6%) y más distante de otras cepas de referencia (por debajo del 86% con otras cepas de referencia próximas). El grupo de *R. leguminosarum* incluyó tres aislados con similitud cercana al 99% con *R. leguminosarum* USDA2370^T, que fueron los perfiles I, II y V. El otro grupo presentó una similitud del 99,5% con *R. leguminosarum* CCBAU657 y en torno al 93% con USDA2370^T. Sólo el perfil XII quedó por debajo del 99% con CCBAU657.

El gen *atpD* presentó una similitud total entre *R. giardinii* y el perfil IX y se observó la inclusión del resto de aislados en un grupo que incluyó a *R. leguminosarum* USDA2370^T y CCBAU657. En este caso, más próximos a USDA2370^T fueron el perfil I, con 100%, los perfiles XIII y V, por encima del 99%, y entre el 92 y el 95% el resto de los aislados.

El análisis de los genes *housekeeping* mostró una mayoría de aislados en el grupo de *R. leguminosarum*, y los aislados del perfil IX, LET1912 y LET1901, como *R. giardinii*. Dentro de los aislados incluidos en *R. leguminosarum* hubo dos subgrupos, que fueron por un lado los perfiles I y V, con alta similitud con *R. leguminosarum* USDA2370^T, y otro subgrupo más próximo a *R. leguminosarum* CCBAU657, que incluyó los perfiles VI, VII, XI y XIV. Existió un mayor número de aislados próximos a *R. leguminosarum* USDA2370^T, que fueron 23 aislados frente a los 17 aislados que se aproximan más a *R. leguminosarum* CCBAU657. El perfil XIII mostró mayor similitud con *R. leguminosarum* CCBAU657 y RPVR24 en el gen *recA* y mayor similitud con *R. leguminosarum* USDA2370^T en el gen *atpD*.

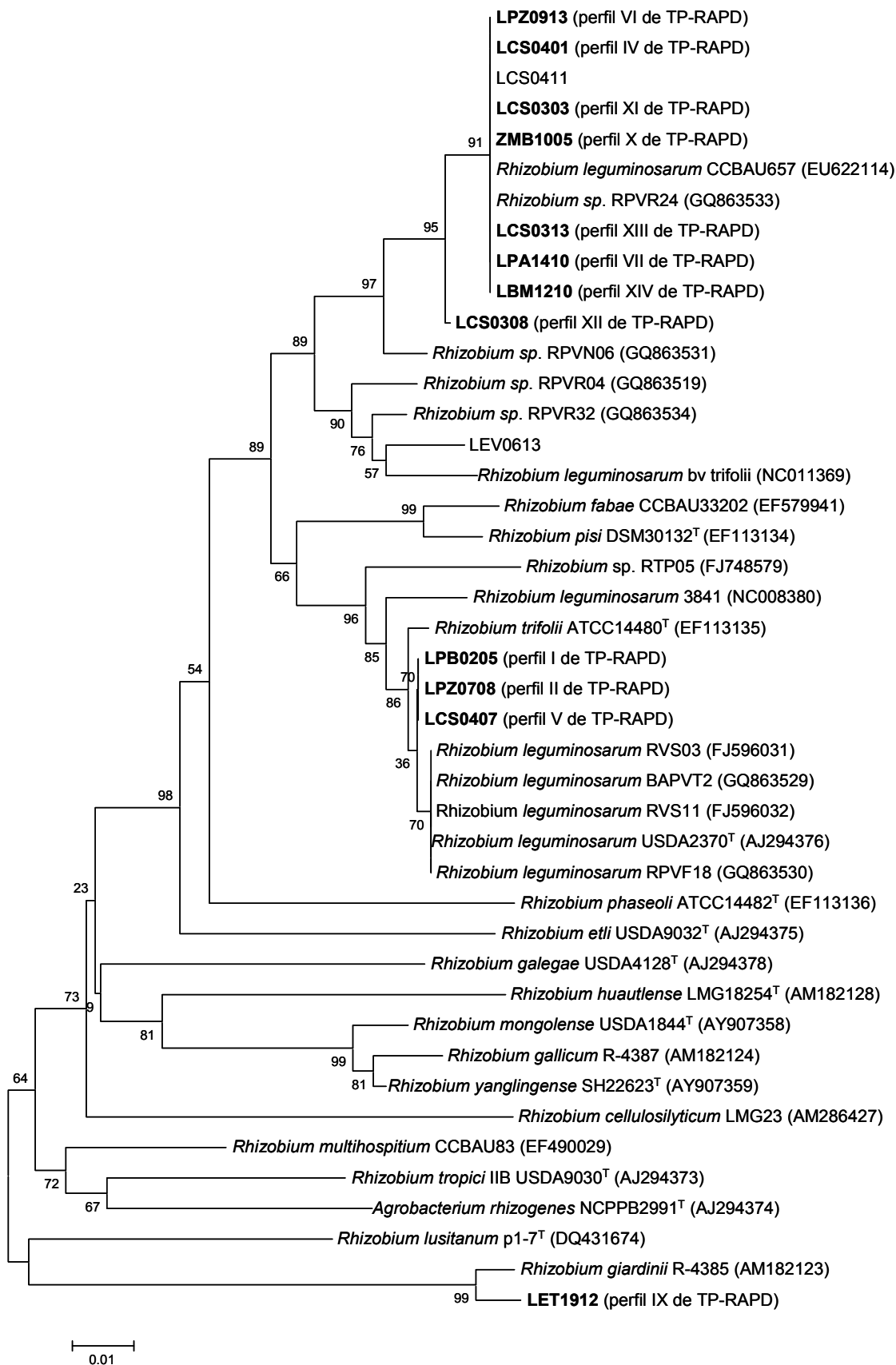


Figura 30. Análisis filogenético del gen *recA* de los aislados y diferentes especies del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas

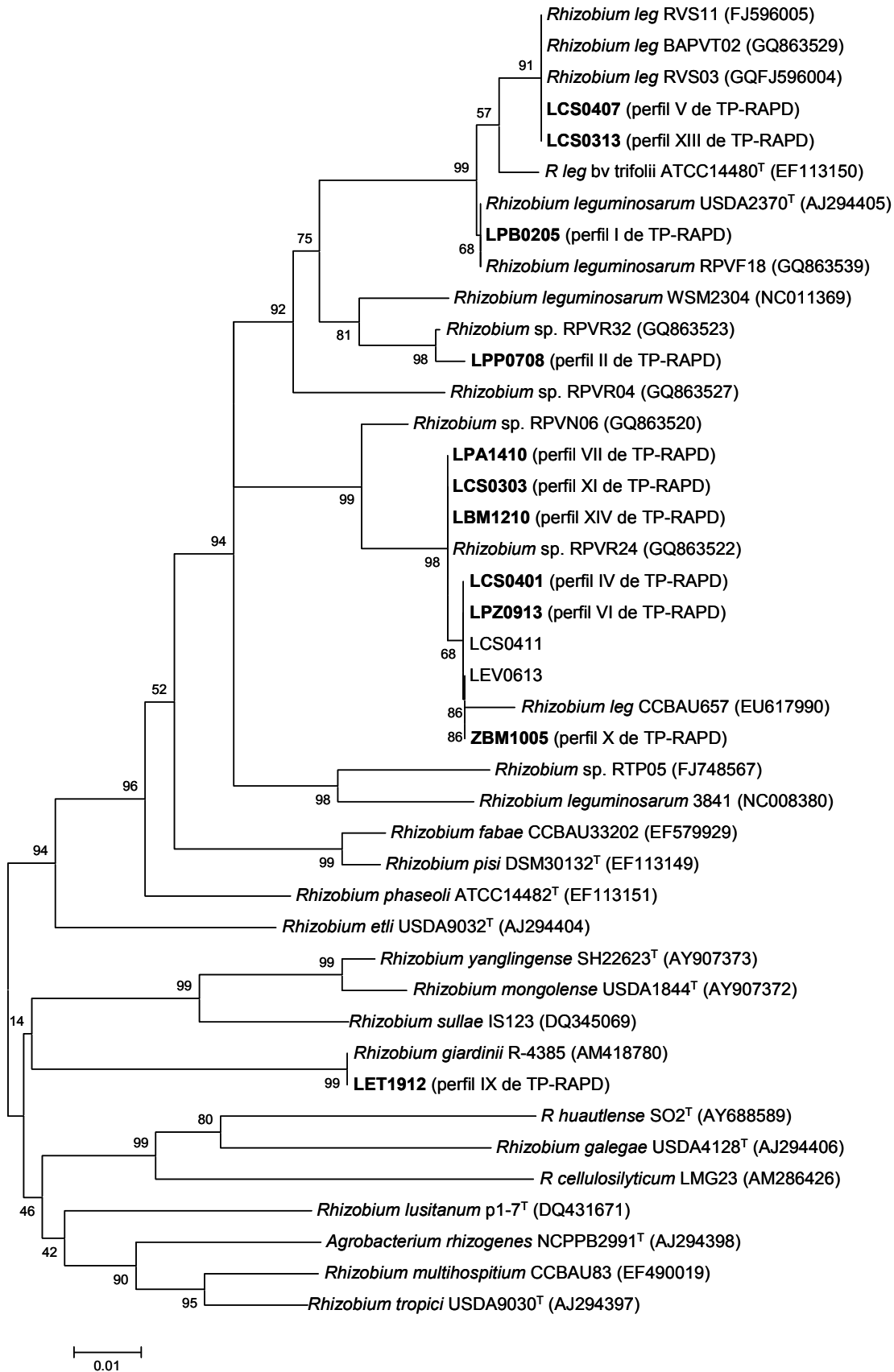


Figura 31. Análisis filogenético del gen *atpD* de los aislados y diferentes especies del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas

Tabla 26. Porcentajes de identidad del gen *recA* de cepas de referencia de *Rhizobium* con los aislados

	<i>R pisi</i>	LBM1210	LPA1410	LCS0313	<i>R leguminosarum</i>	ZBM1005	LCS0303	LPZ0913	LCS0401	LCS0308	LEV0613	<i>R leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	LCS0407	LPB0205	LPP0708	<i>R leguminosarum</i>	<i>R etli</i>	<i>R phaseoli</i>	<i>R tropici</i> IIB	<i>R rhizogenes</i>	<i>R lusitanum</i>	<i>R gallicum</i>	<i>R mongolense</i>	<i>R giardinii</i>	LET1912	<i>R galegae</i>	
<i>R pisi</i>	--																										
LBM1210	84,3	--																									
LPA1410	87,2	100	--																								
LCS0313	82,2	99,8	100	--																							
<i>R leguminosarum</i>	88,5	99,6	99,6	99,6	--																						
ZBM1005	83,0	100	100	100	99,6	--																					
LCS0303	78,5	98,5	100	96,5	99,6	100	--																				
LPZ0913	87,4	99,8	99,8	99,8	99,4	99,8	99,8	--																			
LCS0401	80,7	98,9	100	97,1	99,6	10	94,7	99,8	--																		
LCS0308	83,7	99,2	99,4	98,3	98,9	99,4	95,6	99,2	95,0	--																	
LEV0613	84,9	94,3	94,3	94,5	93,7	94,5	93,2	94,2	93,9	96,3	--																
<i>R legum</i> bv <i>trifolii</i>	79,7	93,8	93,9	94,2	93,2	93,8	89,9	93,6	90,0	93,1	97,4	--															
LCS0407	89,7	93,5	93,5	93,5	93,2	93,5	93,5	93,3	93,5	95,3	94,5	94,9	--														
LPB0205	87,7	92,5	93,5	92,3	91,7	92,1	92,1	92,6	91,9	94,7	93,3	93,5	100	--													
LPP0708	90,1	94,1	93,9	94,1	93,3	94,1	94,1	93,8	94,1	95,7	95,0	95,2	99,6	98,4	--												
<i>R leguminosarum</i>	87,1	93,7	93,7	93,8	92,2	93,0	92,3	93,6	92,5	95,7	94,7	94,4	99,4	97,3	99,8	--											
<i>R etli</i>	83,7	90,9	91,0	90,7	89,1	90,1	89,5	90,8	89,5	92,4	91,4	91,4	91,1	89,0	91,7	91,6											
<i>R phaseoli</i>	85,0	89,7	90,0	89,4	87,3	88,2	88,2	89,6	88,2	91,7	91,1	90,0	90,9	88,6	91,3	91,1	91,1	--									
<i>R tropici</i> IIB	81,8	87,1	87,6	87,0	85,8	86,4	85,9	87,6	86,1	89,1	87,3	86,5	88,1	86,1	88,3	88,2	87,6	86,6	--								
<i>R. rhizogenes</i>	81,8	85,7	85,7	85,6	84,3	85,0	84,6	86,2	84,8	88,1	87,3	86,3	88,9	86,9	89,5	88,9	88,7	86,6	93,1	--							
<i>R lusitanum</i>	78,6	86,6	86,8	86,7	84,7	85,4	82,8	87,2	83,5	87,3	87,9	86,9	87,7	85,7	88,3	87,8	87,8	87,1	91,0	91,9	--						
<i>R gallicum</i>	79,8	88,2	87,8	88,6	86,9	87,9	86,2	87,6	86,6	90,0	89,2	89,8	90,0	89,9	90,4	90,6	88,5	88,9	87,3	88,1	87,8	--					
<i>R mongolense</i>	89,6	88,0	88,2	87,6	87,1	87,1	87,1	87,8	87,1	89,6	89,0	88,9	90,9	88,3	90,7	90,4	88,5	88,5	87,3	88,1	87,9	97,5	--				
<i>R giardinii</i>	75,2	83,1	83,1	83,4	82,3	83,0	81,4	83,3	81,8	84,5	83,9	84,0	83,1	83,1	83,3	83,6	84,8	82,7	86,1	85,9	86,4	85,8	86,0	--			
LET1912	83,5	83,6	83,7	83,5	83,1	83,5	83,5	83,9	83,5	84,9	83,8	83,5	82,8	81,0	83,0	83,3	85,4	84,1	86,4	86,2	86,2	84,7	85,9	98,6	--		
<i>R galegae</i>	79,9	87,5	87,8	87,3	87,2	87,0	86,3	88,2	85,9	89,3	88,6	87,8	87,5	85,7	87,7	87,2	88,4	86,8	86,3	85,7	86,3	87,1	89,8	86,1	86,2	--	

Tabla 27. Porcentajes de identidad del gen *atpD* de cepas de referencia de *Rhizobium* con los aislados

	<i>R tropici</i> IIB	<i>R etli</i>	<i>R phaseoli</i>	LCS0313	LCS0407	<i>R leguminosarum</i> bv trifolii	<i>R legum</i>	LPB0205	LPP0708	LBM1210	LCS0303	LCS0401	LPA1410	LEV0613	ZBM1005	LPZ0913	<i>R fabae</i>	<i>R pisi</i>	<i>R giardinii</i>	LET1912	<i>R cellulosilyticum</i>	<i>R lusitanum</i>	<i>R mongolense</i>	<i>R sullae</i>	<i>R rhizogenes</i>	<i>R galegae</i>	
<i>R tropici</i> IIB	--																										
<i>R etli</i>	92,6	--																									
<i>R phaseoli</i>	91,7	94,1	--																								
LCS0313	86,7	88,7	89,7	--																							
LCS0407	86,7	88,7	90,6	99,6	--																						
<i>R leguminosarum</i> bv trifolii	86,2	88,7	91,0	98,6	98,5	--																					
<i>R leguminosarum</i>	87,4	89,4	91,4	99,1	99,1	98,9	--																				
LPB0205	87,4	89,4	91,7	99,2	99,1	98,7	100	--																			
LPP0708	88,5	91,0	93,0	93,8	93,6	93,9	94,3	94,8	--																		
LBM1210	89,6	91,1	93,0	91,8	91,2	91,5	92,1	92,7	93,7	--																	
LCS0303	89,6	91,2	93,2	91,6	91,0	91,4	91,9	92,5	93,6	99,8	--																
LCS0401	89,6	91,2	92,8	91,0	91,0	91,3	91,9	92,5	93,5	99,6	99,6	--															
LPA1410	89,8	91,4	92,9	91,5	91,2	91,5	92,1	92,3	93,6	99,8	99,8	99,6	--														
LEV0613	89,6	91,2	91,3	91,7	91,0	91,3	91,9	92,5	93,6	99,6	99,6	99,4	99,8	--													
ZBM1005	89,6	91,2	92,8	91,3	91,0	91,6	91,9	92,3	93,4	99,6	99,6	100	99,8	100	--												
LPZ0913	89,6	91,2	92,8	91,5	91,0	91,3	91,9	92,5	93,5	99,8	99,6	100	99,8	100	100	--											
<i>R fabae</i>	90,3	92,2	93,2	91,7	91,6	91,9	92,2	92,4	92,7	93,1	93,1	93,0	93,4	93,0	93,1	93,1	--										
<i>R pisi</i>	89,8	91,4	92,1	91,2	90,8	90,9	91,4	91,7	92,6	93,2	93,4	92,5	93,1	92,9	92,8	92,9	98,3	--									
<i>R giardinii</i>	91,4	90,7	90,5	87,1	87,1	87,3	87,8	87,9	88,8	89,4	89,5	89,7	89,9	89,7	89,5	89,5	90,0	89,5	--								
LET1912	91,4	90,7	90,7	87,3	87,2	87,4	87,8	88,0	89,1	89,5	89,6	89,6	89,9	89,6	89,7	89,5	90,0	89,8	100	--							
<i>R cellulosilyticum</i>	88,7	89,4	88,3	85,2	85,3	84,7	85,1	85,5	86,8	86,3	86,4	86,6	86,9	86,6	86,4	86,3	87,3	87,4	87,6	87,6	--						
<i>R lusitanum</i>	91,9	89,8	88,5	88,7	87,8	87,8	88,5	88,7	89,4	90,3	90,6	89,8	90,7	90,6	89,9	90,1	89,6	90,8	90,3	90,2	87,6	--					
<i>R mongolense</i>	88,9	88,2	88,6	85,9	85,9	85,9	86,6	86,6	86,6	87,6	87,7	87,3	87,5	87,3	87,3	87,2	89,8	89,3	89,6	89,6	85,2	89,6	--				
<i>R sullae</i>	91,4	89,3	88,3	85,2	87,3	87,5	87,7	87,8	88,1	89,4	89,5	88,2	88,1	87,0	89,5	89,5	88,7	89,0	89,9	90,0	87,0	87,9	95,1	--			
<i>R rhizogenes</i>	94,3	91,3	90,2	87,9	87,9	87,7	88,4	88,4	88,8	89,7	89,7	89,7	90,0	89,7	89,7	89,7	89,8	89,7	90,9	90,9	90,2	94,1	88,7	89,2	--		
<i>R galegae</i>	88,9	89,6	87,8	84,7	84,6	84,4	85,1	85,1	86,7	88,2	88,2	88,3	88,5	88,3	88,3	88,2	88,9	88,9	89,6	89,6	90,1	88,9	87,7	88,8	90,2	--	

4.2.2.3. Secuenciación y análisis filogenético del ITS

El análisis de relaciones filogenéticas basadas en la secuencia del ITS (*internally transcribed spacer*) ha sido ampliamente utilizada en taxonomía e identificación de los rizobios mostrando su utilidad para delimitar especies dentro de cada género (Kwon *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2007; Santillana *et al.*, 2008; Sawada *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 2005a; Wernegreen & Riley, 1999; Yanagi & Yamasato, 1993; Young *et al.*, 2001; Young, 1996; Young & Haukka, 1996). Este fragmento intergénico permite examinar variaciones genéticas a nivel intraespecífico por estar menos conservado que la mayoría de los genes *housekeeping* y sobre todo que el gen ribosómico 16S (Barry *et al.*, 1991). Sin embargo, al cumplir funciones en el procesamiento, transcripción y ensamblaje de los ribosomas (Liiv *et al.*, 1998) los ITS poseen algunas regiones conservadas que permiten establecer relaciones filogenéticas. Estas regiones contienen dos ARNt (ARNt_{ile} y ARNt_{ala}), que están muy conservadas y son útiles para confirmar delimitaciones al nivel de especie (Lebuhn *et al.*, 2006). El tamaño del ITS oscila entre 1100 y 1300 pb, con variaciones en la longitud a nivel subespecífico atribuidas a los insertos en regiones no codificantes (Lebuhn *et al.*, 2006).

El árbol filogenético de la figura 32 presenta la localización de los aislados de los grupos TP-RAPD dentro de la familia *Rhizobiaceae* basada en el ITS y la tabla 28 presenta los porcentajes de identidad de las secuencias del ITS con algunas cepas de referencia.

La distribución de las cepas en el árbol construido a partir del análisis de las secuencias del ITS difiere de la basada en los otros genes, aunque mantiene la distribución en dos grupos filogenéticamente divergentes, uno próximo a *R. leguminosarum* (perfiles de TP-RAPD I, II, IV, V, VI, VII, X, XI, XII, XIII y XIV) y otro próximo a *R. giardinii* (cepas con el perfil IX).

Las cepas del perfil X mostraron 100% de identidad en con respecto a la cepa tipo de *R. leguminosarum* USDA 2370^T y la del perfil XIII más del 99% de identidad. El resto de las cepas mostraron porcentajes de similitud variables con respecto a la cepa USDA 2370^T, que fueron inferiores al 93%. En el caso de las cepas que presentaron los perfiles I, VII y XIV fueron más próximas a *R. phaseoli* ATCC 14482^T (en torno al 95% de similitud) que a la cepa *R. leguminosarum* USDA 2370^T con similitudes en torno al 85%. Asimismo las cepas que presentaron el perfil XII fueron más próximas a *R. pisi* con un 91% de similitud.

Algunos de los valores de similitud encontrados en la secuencia del fragmento de ITS de los aislados de este estudio con respecto a las cepas tipo de las especies actualmente válidas son menores que los existentes entre ellas, por lo que, al igual que ocurría en el caso de los genes *recA* y *atpD* indican la posibilidad de la existencia de más especies del género *Rhizobium* de las actualmente descritas.

Las cepas del perfil IX de TP-RAPD presentaron 99,5% de identidad con respecto a la cepa tipo de *R. giardinii*, lo que confirma su identificación.

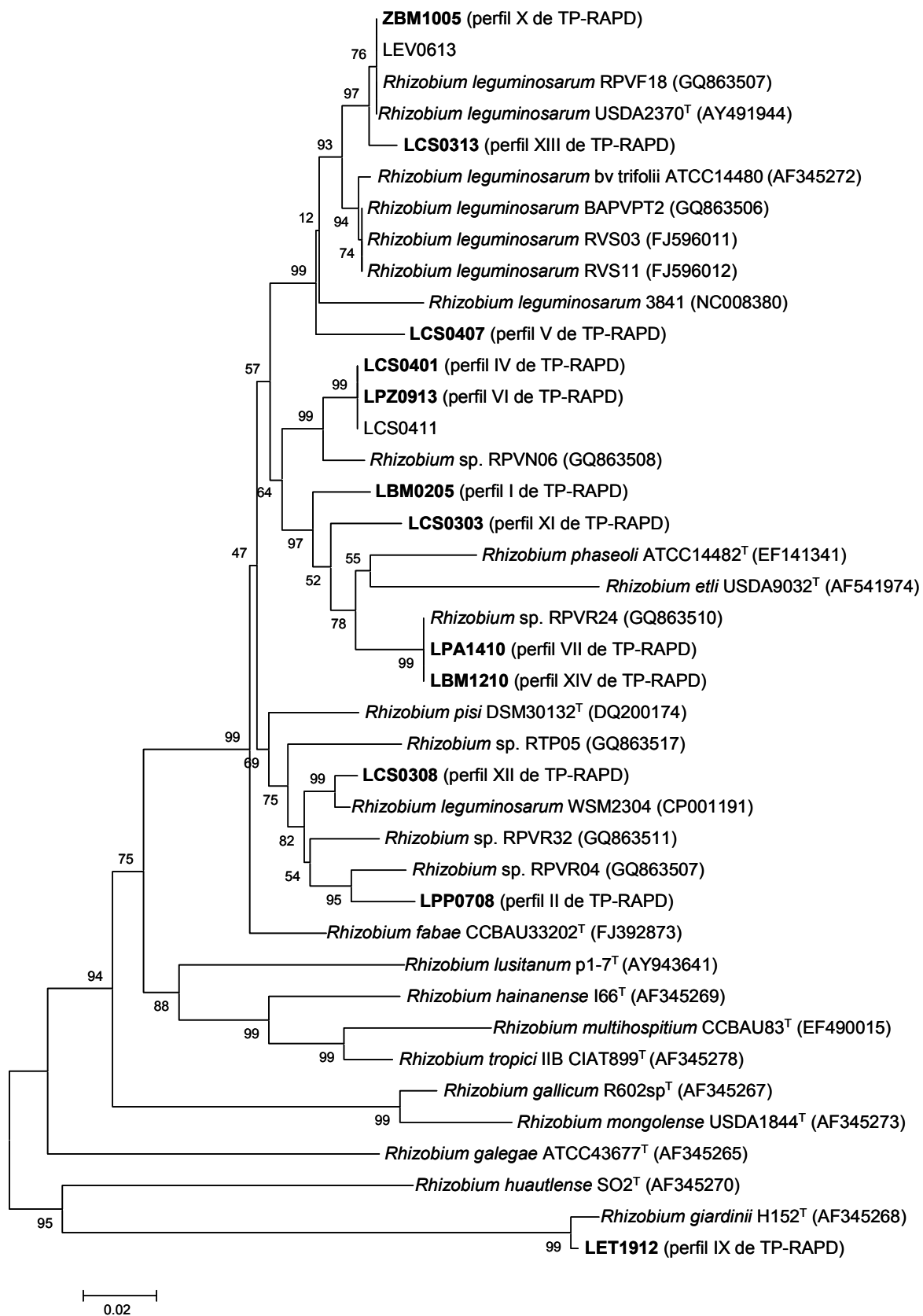


Figura 32. Análisis filogenético del ITS de los aislados y diferentes especies del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas

Tabla 28. Porcentaje de identidad del ITS de cepas de referencia de *Rhizobium* con los aislados

	<i>R fabae</i>	LCS0407	LCS0308	<i>R leguminosarum</i> bv trifolii	ZBM1005	LEV0613	LCS0313	<i>R leguminosarum</i>	LPP0708	<i>R giardinii</i>	LET1912	<i>R huautlense</i>	LCS0401	LPZ0913	LCS0303	<i>R pisi</i>	LBM1210	LPA1410	LPB0205	<i>R phaseoli</i>	<i>R tropici</i> IIB	<i>R gallicum</i>	<i>R etli</i>	<i>R lusitanum</i>
<i>R fabae</i>	---																							
LCS0407	91,8	---																						
LCS0308	86,5	85,3	---																					
<i>R leguminosarum</i> bv trifolii	88,2	90,4	89,6	---																				
ZBM1005	86,4	92,8	88,1	97,5	---																			
LEV0613	85,7	92,4	88,8	97,2	99,9	---																		
LCS0313	86,9	91,8	87,9	96,5	98,8	98,8	---																	
<i>R leguminosarum</i>	86,4	92,8	88,1	97,5	100,0	99,9	98,8	---																
LPP0708	86,3	88,3	89,1	87,7	90,4	90,9	89,8	90,4	---															
<i>R giardinii</i>	71,8	71,3	70,2	69,7	69,0	68,0	67,8	69,2	69,6	---														
LET1912	72,8	72,5	72,3	71,7	71,1	70,3	69,3	71,1	72,0	99,5	---													
<i>R huautlense</i>	74,6	73,2	73,1	71,3	70,3	69,6	70,1	70,5	71,4	73,9	73,3	---												
LCS0401	86,2	87,1	92,2	91,7	90,4	90,6	90,0	90,4	86,9	70,4	72,4	72,9	---											
LPZ0913	86,2	86,8	92,0	91,5	90,2	90,3	90,2	90,2	87,2	70,6	72,6	72,9	99,7	---										
LCS0303	85,5	86,4	90,5	91,0	89,6	89,6	89,6	89,6	88,0	71,1	72,7	74,0	96,5	96,7	---									
<i>R pisi</i>	86,9	85,7	91,0	89,3	87,5	86,9	87,2	87,5	84,8	73,2	74,8	74,6	88,6	88,3	87,5	---								
LBM1210	86,4	85,4	84,4	86,0	84,6	84,1	84,1	84,6	85,3	73,3	74,9	75,2	90,2	89,8	88,9	84,5	---							
LPA1410	86,2	85,3	84,7	86,0	84,8	84,3	84,1	84,8	85,7	73,6	75,4	75,2	90,3	90,1	89,2	84,7	99,9	---						
LPB0205	87,6	86,5	85,7	86,9	85,7	85,4	84,9	85,6	84,5	72,6	74,5	74,4	91,1	90,7	87,7	85,8	98,3	98,2	---					
<i>R phaseoli</i>	84,7	83,4	84,3	84,8	83,2	82,6	82,7	83,2	87,3	73,4	75,3	75,0	86,0	85,9	85,6	83,6	95,0	95,1	93,8	---				
<i>R tropici</i> IIB	81,2	78,2	78,8	78,7	77,0	76,6	76,8	77,2	75,8	70,5	70,3	72,5	77,9	78,0	77,5	80,6	79,9	80,0	80,8	78,9	---			
<i>R gallicum</i>	79,4	79,3	79,5	77,9	79,1	79,3	78,9	79,3	79,3	72,9	72,8	75,3	78,5	78,4	78,0	80,1	80,6	80,1	81,5	78,5	81,3	---		
<i>R etli</i>	78,0	75,6	77,5	75,6	73,7	72,1	73,8	73,2	75,8	73,6	70,3	73,3	76,4	76,5	77,2	77,0	80,5	80,0	79,2	81,1	81,0	85,0	---	
<i>R lusitanum</i>	77,8	77,4	76,6	76,1	76,3	75,6	75,8	76,3	77,1	68,1	69,3	71,2	76,1	76,2	75,4	78,6	77,2	77,4	78,3	76,2	79,8	76,5	70,0	---

De acuerdo con los análisis de los genes ribosómicos, de los genes *recA* y *atpD* así como del ITS se comprueba una presencia mayoritaria de *R. leguminosarum* en los suelos del noroeste de España. Estos resultados coinciden con los encontrados por García-Fraile *et al.* (2010), pero contrastan con otros estudios llevados a cabo en el sur de España en los que se ha encontrado que la especie mayoritaria en los nódulos de la alubia es *R. etli* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). También contrastan con los resultados obtenidos en países americanos como Brasil y Argentina, donde las especies predominantes son distintas. Aguilar *et al.* (2001) encontraron que en el noroeste de Argentina predominó *R. etli*, y con una presencia menor se encontró *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *Sinorhizobium* sp. y *Mesorhizobium* sp. Resultados similares obtuvieron Mostasso *et al.* (2002), Grange & Hungria (2004) y Ribeiro *et al.*, (2009) estudiando rizobios de alubia y Aguilar *et al.* (1998) analizando nódulos de *P. vulgaris* silvestre. En muchos de estos estudios *R. tropici* ha resultado ser la especie predominante (Hungria *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008; Stocco *et al.*, 2008). No obstante, sería necesario estandarizar los métodos de muestreo ya que Alberton *et al.* (2006) demostraron que el método de muestreo puede hacer variar cualitativa y cuantitativamente los resultados del análisis de las poblaciones de rizobios.

En estudios de identificación de aislados llevados a cabo en otros lugares del mundo, distantes de los centros de origen de *Phaseolus*, se han encontrado diversas especies. Así, en Marruecos se ha aislado *R. tropici* (Priefer *et al.*, 2001), mientras que en Egipto el análisis del gen ribosómico 16S permitió identificar a *R. leguminosarum* y *R. etli*. Martínez-Romero (2003) resaltó la baja biodiversidad de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* en Europa, algo que vinculó con el hecho de que la alubia sea un cultivo de introducción relativamente reciente en este continente, ya que la proximidad filoténica con *R. leguminosarum* bv *viciae* o bv *trifolii* sugiere una transferencia de la isla simbiótica desde *R. etli*.

Aquí se ha observado el predominio de *R. leguminosarum* entre los rizobios que nodulan alubia en el noroeste de España que contrasta con los resultados del sur de España, pero es necesario considerar las diferencias de las condiciones ambientales entre estos lugares. En los estudios llevados a cabo en el sur de España los suelos evaluados tenían valores más altos de pH y temperaturas medias más elevadas en comparación con el noroeste de Castilla y León. Poustini *et al.* (2005) consideraron una temperatura óptima del suelo para la nodulación y fijación de N₂ de 25 °C, lo que dista mucho de la temperatura mínima del suelo en el noroeste de Castilla y León durante el cultivo de la alubia, con lo que cabría esperar diferencias en las poblaciones microbianas. En el valle del Guadalquivir, el 73% de los aislados pertenecieron a *R. etli*, y con menor abundancia se identificó *R. gallicum*, *R. giardinii*, *Sinorhizobium fredii*, *R. leguminosarum* bv *phaseoli* y *R. leguminosarum* bv *viciae* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). De igual modo, en Granada, *R. etli* fue predominante, pero con una distancia filogenética relativamente alta con *R. etli* CFN42^T, originaria de México. No

obstante, algunos aislados de México presentaron elevada similitud con los de Granada, sugiriendo un origen americano de las cepas del sur de España (Herrera-Cervera *et al.*, 1999). El aislamiento de *R. gallicum*, *R. giardinii* y *R. leguminosarum* en los diferentes suelos del sur de España ocurrió en los suelos con poblaciones de rizobios reducidas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000; Herrera Cervera *et al.*, 1999; Amarger *et al.*, 1997). Esta misma conclusión podría deducirse del estudio de Mostasso *et al.* (2002) en Brasil, donde *R. giardinii* se encontró de forma testimonial (dos aislados en una colección de 36 aislados). En Castilla y León, los dos aislados identificados como *R. giardinii* provenían de una parcela en la que no se había cultivado alubia durante los últimos 16 años y, de hecho, el número de plantas extraídas para obtener los nódulos fue muy elevado (datos no mostrados).

Las diferencias en las especies que nodulan alubia en diferentes localizaciones geográficas podría estar ligada a las diferentes condiciones ambientales, pero también a la selección por parte de la bacteria y/o de la planta de una determinada isla o plásmido ligados a diferentes especies.

4.2.3. Secuenciación y análisis del gen *nodC*

Los genes de nodulación de los rizobios, genes *nod*, se encuentran en islas o plásmidos simbióticas y codifican la síntesis de factores nod cuya expresión está inducida por los flavonoides de las plantas. (Perret *et al.*, 2000). Los genes *nod* han evolucionado sobre la base de un óptimo establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio (Broughton & Perret, 1999; Dobert *et al.*, 1994) y su estudio sirve para determinar el rango de hospedador de la planta, como se ha descrito para los genes *nodB* (Wei *et al.*, 2003) y *nodC* (Iglesias *et al.*, 2006; Álvarez Martínez, 2007; Laguerre *et al.*, 2001).

Los estudios filogenéticos basados en los genes *nod* permiten deducir la coevolución de los rizobios con sus plantas hospedadoras (Álvarez Martínez, 2007) así como su origen biogeográfico (Aguilar *et al.*, 2004). El gen *nodC* es esencial en la capacidad para nodular de los rizobios de crecimiento rápido investigados hasta el momento (Laguerre *et al.*, 2001) y codifica para una N-acetil-glucosaminil-transferasa implicada en la síntesis de los factores Nod. Esto y su tamaño relativamente grande hacen que pueda emplearse como marcador filogenético. El gen *nodC* está relacionado con 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 rizobios se están definiendo en función 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 *phaseoli* de las especies *R. leguminosarum* y *R. phaseoli* (García-Fraile *et al.*, 2010), *R. giardinii* y *R. gallicum* (Amarger

et al., 1997) y *R. etli* (Wang *et al.*, 1999a) y en una biovariedad de *Sinorhizobium meliloti* y *S. fredii* denominada *mediterraneanse* (Mnasri *et al.*, 2007).

Las secuencias del gen *nodC* se analizaron en cepas representativas de los diferentes perfiles de TP-RAPD y el árbol filogenético obtenido se muestra en la figura 33. La tabla 29 muestra los porcentajes de identidad con cepas de referencia del género *Rhizobium*.

A diferencia de los genes cromosómicos, el gen *nodC* presenta similitudes mayores entre aislados con la capacidad para nodular la misma planta, aunque sean especies diferentes, por ello las biovariedades de las especies se están comenzando a definir sobre la base de este gen (Laguerre *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2007). En este estudio el gen *nodC* han presentado similitudes superiores al 95%) con respecto a la cepa de referencia *R. phaseoli* ATCC14482^T y a cepas de la biovariedad phaseoli de especies como *R. etli*, *R. giardinii* y *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Los aislados evaluados en este estudio se agrupan todos en la biovariedad phaseoli, lo que coincide con estudios previos de aislados en Castilla y León (García Fraile, 2008, Tesis Doctoral), donde además se observa un grupo compacto de la biovariedad phaseoli en todos los aislados que nodulan *Phaseolus* en el oeste de España, a diferencia de lo que ocurre en el sur, donde las biovariedades predominantes fueron *mediterraneanse* y *gallicum*. Por ello, se propone el empleo del gen *nodC* para el estudio de la distribución geográfica de los rizobios, de igual modo que el gen *nodA* se ha propuesto para *Bradyrhizobium* (Stepkowsky *et al.*, 2007).

El gen *nodC* de las cepas identificadas como *R. giardinii* no fue posible amplificarlo, aunque eso no implica que estas cepas no tengan genes de nodulación filogenéticamente muy divergentes de los conocidos hasta este momento.

Los resultados obtenidos tras el análisis del gen *nodC* sugieren una selección por parte del hospedador de las cepas que contienen los genes *nodC* del biovar phaseoli ya que el 100% de las cepas analizadas presentaron dos alelos del gen *nodC* con secuencias muy próximas filogenéticamente próximas entre sí. Puesto que estos dos alelos (α y γ) fueron los alelos mayoritarios en el sur de España y se han hallado en cepas de *R. etli* americanas, parece razonable pensar que los genes simbióticos presentes actualmente en España proceden de cepas americanas de *R. etli* y fueron transferidos en algún momento a cepas de *R. leguminosarum* nativas (García-Fraile *et al.*, 2010).

Yates *et al.* (2008) observaron una selección por parte de la planta hospedadora (*Trifolium* sp.) del rizobio más eficiente, es decir, la búsqueda de la rentabilidad en la simbiosis en el caso de una mezcla de rizobios de diferente eficiencia. Desde este punto de vista sorprende el aislamiento a partir de nódulos de alubia de cepas de *R. giardinii*, algunas de las cuáles no son capaces de reinfectar a la planta de la que se aíslan, como ocurre en el caso de *Arachis* (Ibáñez *et al.*, 2008), en estos casos la presencia de esta especie en nódulos puede deberse a que aprovecha la vía de entrada de otras cepas de rizobios.

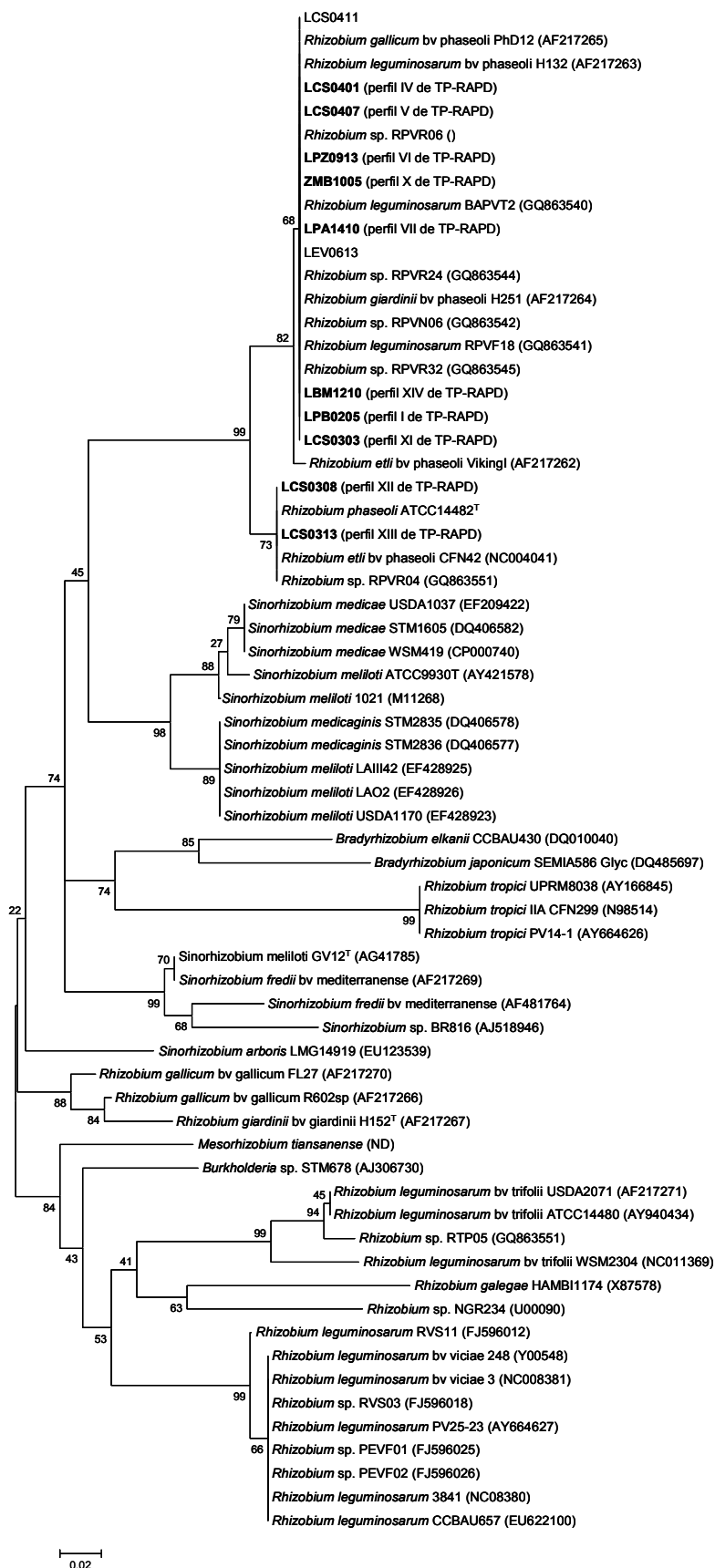


Figura 33. Análisis filogenético del gen *nodC* de los aislados y diferentes especies del género *Rhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros, basándose en 1000 réplicas

Tabla 29. Porcentaje de identidad del gen *nodC* de cepas de referencia de *Rhizobium* con el de los aislados

	<i>R leguminosarum</i>	<i>R leguminosarum</i> bv viciae	<i>R galegae</i>	LCS0303	LPB0205	LBM1210	<i>R giardinii</i> bv phaseoli	LPA1410	ZBM1005	LPZ0913	LCS0407	LCS0401	<i>R leguminosarum</i> bv phaseoli	LCS0401	<i>R gallicum</i> bv phaseoli	LCS0308	<i>R phaseoli</i>	LCS0313	<i>R etli</i> bv phaseoli	<i>R gallicum</i> bv gallicum	<i>R giardinii</i> bv giardinii	<i>R tropici</i>	<i>R tropici</i> IIB	<i>B elkanii</i>	<i>B japonicum</i>	RNGR234	
<i>R leguminosarum</i>	---																										
<i>R leguminosarum</i> bv viciae	75,8	---																									
<i>R galegae</i>	65,5	70,0																									
LCS0303	69,2	71,8	65,3	---																							
LPB0205	69,3	71,9	65,3	99,9	---																						
LBM1210	68,1	71,8	64,0	100	99,9	---																					
<i>R giardinii</i> bv phaseoli	68,9	72,3	65,5	99,5	99,5	99,5	---																				
LPA1410	68,1	71,8	64,0	100	99,9	100	99,5	---																			
ZBM1005	68,1	71,8	64,0	100	99,9	100	99,5	100	---																		
LPZ0913	68,1	71,8	64,0	100	99,9	100	99,5	100	100	---																	
LCS0407	69,3	71,7	65,4	100	99,9	100	99,5	100	100	100	---																
LCS0401	68,3	71,7	64,2	100	99,9	100	99,5	100	100	100	100	---															
<i>R leguminosarum</i> bv phaseoli	68,3	71,7	64,2	100	99,9	100	99,5	100	100	100	100	100	---														
LCS0401	69,3	71,6	65,6	100	99,9	100	99,5	100	100	100	100	100	100	---													
<i>R gallicum</i> bv phaseoli	68,7	72,0	64,0	98,7	98,6	98,4	98,1	98,4	98,4	98,4	98,8	98,7	98,7	98,8	---												
LCS0308	70,1	72,2	65,8	96,6	96,5	96,6	96,2	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	96,7	97,0	---											
<i>R phaseoli</i>	68,9	72,1	64,2	96,7	96,5	96,3	96,2	96,3	96,3	96,3	96,6	96,5	96,5	96,7	96,8	99,8	---										
LCS0313	69,5	72,2	64,6	96,7	96,5	96,6	96,2	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	96,7	97,0	100	99,7	---									
<i>R etli</i> bv phaseoli	64,8	72,2	61,3	96,8	96,7	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	96,7	96,7	96,7	96,8	97,1	99,9	99,5	99,9	---								
<i>R gallicum</i> bv gallicum	72,1	76,8	67,9	82,9	82,8	83,0	83,1	83,0	83,0	83,0	82,9	83,0	83,0	83,0	83,1	83,4	83,2	83,5	83,4	---							
<i>R giardinii</i> bv giardinii	71,2	75,5	66,4	82,4	82,3	81,4	82,6	81,4	81,4	81,4	82,3	81,7	81,7	82,4	81,6	82,3	80,9	81,7	81,8	90,8	---						
<i>R tropici</i>	69,0	72,0	66,6	75,0	74,9	74,8	75,1	74,8	74,8	74,8	75,0	74,8	74,8	74,9	75,0	75,0	74,8	74,8	74,9	79,0	75,3	---					
<i>R tropici</i> IIB	65,6	73,1	63,0	76,3	76,2	75,5	76,2	75,5	75,5	75,5	76,1	75,6	75,6	76,1	75,8	76,6	75,7	76,2	70,1	79,8	76,6	98,2	---				
<i>B elkanii</i>	67,3	73,2	67,1	73,9	74,1	73,7	74,7	73,7	73,7	73,7	73,9	73,8	73,8	74,0	73,8	74,0	73,5	73,8	73,7	77,3	75,4	73,8	74,3	---			
<i>B japonicum</i>	62,2	69,5	59,9	72,2	72,4	71,5	72,2	71,5	71,5	71,5	72,0	71,7	71,7	72,1	71,9	72,8	72,3	72,4	66,7	73,7	72,1	72,1	67,6	83,1	---		
RNGR234	66,3	75,3	64,0	75,0	75,0	74,2	75,3	74,2	74,2	74,2	75,0	74,7	74,7	75,2	75,3	75,5	74,6	75,1	72,0	80,3	78,4	74,0	71,6	74,2	69,1	---	

4.3. Análisis de las características fenotípicas

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

Las características fisiológicas de los aislados son intrínsecas de cada uno de ellos y se observan y utilizan como indicadores de variación entre cepas de una misma especie. En el caso de los rizobios se han observado diferencias entre especies de un mismo género en cuanto a la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas, (De Lajudie *et al.*, 1994; Graham & Parker, 1964; Hartel & Alexander, 1984; Michiels *et al.*, 1994; Munevar & Wollum, 1981; Surange *et al.*, 1997), acidez y alcalinidad (Aarons & Graham, 1991; Elidrissi *et al.*, 1996; Graham & Parker, 1964; Graham *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1994; Hartel & Alexander, 1983; Surange *et al.*, 1997) y salinidad (Bhardwaj, 1975; Elbeltagy *et al.*, 2001; Mendez-Castro & Alexander, 1976; Saxena & Rewari, 1992).

La tabla 30 muestra el crecimiento o ausencia de crecimiento de los aislados junto a las cepas de referencia evaluadas conjuntamente a distintas temperaturas, valores de pH y concentración salina (NaCl) en el medio.

Todas las cepas mostraron un buen crecimiento a 28°C, que es la temperatura óptima de crecimiento de los rizobios. Las únicas cepas de referencia con capacidad para crecer a 37°C fueron *Rhizobium leguminosarum*, *R. pisi*, *R. gallicum* y *R. giardinii*, y esta última creció a 45°C. A 5°C sólo crecieron *R. leguminosarum* y *R. pisi*. Por tanto la mayor tolerancia a la temperatura la presentaron *R. leguminosarum* y *R. pisi*, entre 5 y 37°C, y *R. giardinii*, entre 12 y 45°C. De los aislados, los únicos que presentaron crecimiento a 45°C fueron LET1901 y LET1912, al igual que ocurre en el caso de la cepa tipo de *R. giardinii*. A 37°C crecieron el 35% de los aislados con representación de todas las comarcas (LPB0114, LCS0404, LCS0407, LCS0408, LCS0411, LEV0601, LEV0612, LEV0613, LPZ0914, ZBM1007, ZBM1008, LBM1101, LBM1113, LBM1123, LBM1209, LPA1403, LET1901 y LET1912). Todos los aislados crecieron a 12°C, mientras que a 5°C sólo presentaron crecimiento los aislados LCS0411, LEV0601, ZBM1008, LBM1101 y LBM1210.

En cuanto al pH, los rizobios presentan un pH óptimo de crecimiento en torno a la neutralidad, por eso se evaluó el crecimiento de los aislados sobre medio de cultivo con valores de pH de 5, 6 y 8 (tabla 30).

Rhizobium tropici IIB y *R. giardinii* son los únicos que crecieron en pH 8, mientras que a pH 6 crecieron todos excepto *R. gallicum* y *R. etli*. En un medio de mayor acidez (pH 5) crecieron todos excepto *R. etli*, *R. giardinii* y *R. leguminosarum* que no crecieron y *R. leguminosarum* bv trifolii que creció débilmente. El rango mayor de tolerancia al pH lo presentó *R. tropici* IIB, mientras que *R. etli* fue el más estricto.

Todos los aislados crecieron a pH 6, pero ninguno lo hizo a pH 8, prácticamente todos crecieron a pH 6, excepto los aislados LET1901, LET1912, ZBM1005, ZBM1007 y ZBM1008. A pH 5 sólo crecieron los aislados LCS0403, LET1901, LPP0703, LPP0704 y LBM1210. Los aislados LEV0602, LEV0605, LEV0607, ZBM1008 y LCS0404 presentaron crecimiento débil a pH 5.

Todas las cepas de referencia estudiadas, excepto *Rhizobium etli* y *R. leguminosarum* bv trifolii, fueron capaces de crecer en una concentración de 0,5% NaCl (tabla 30). *R. tropici* IIA creció hasta el 2,5% de NaCl, mientras que *R. tropici* IIB presentó crecimiento hasta el 2,5% NaCl. *R. leguminosarum* bv trifolii, *R. leguminosarum* y *R. pisi* fueron los más sensibles, llegando a crecer al 0,5% NaCl. De los aislados, el 59% fue capaz de crecer en presencia del 0,5% de NaCl, el 33% toleró el 1% de NaCl y el 22% presentó crecimiento, aunque débil, al 1,5% de NaCl. Los aislados LET1912 y LET1901 crecieron débilmente a 1,5%, al igual que *R. giardinii*. El aislado LBM1210 fue la cepa con mayor tolerancia a altas concentraciones de sal al mostrar un crecimiento vigoroso hasta en presencia del 2% NaCl. Los aislados LCS0308, LEV0603 y LEV0613 presentaron mayor tolerancia a altas concentraciones salinas que el resto de los aislados de su mismo origen geográfico.

4.3.2. Resistencia natural a antibióticos

El espectro de resistencia a antibióticos de los aislados es una información relevante de la que se puede inferir la evolución conjunta de especies microbianas provenientes del mismo hábitat, con lo que se ha establecido como una prueba de la caracterización bacteriana. Existen numerosos trabajos sobre la tolerancia de los rizobios a los antibióticos (Amarger, 2001; Cole & Elkan, 1979; Graham, 1963; Hagedorn, 1979).

La resistencia natural a antibióticos se ha utilizado como criterio para describir la diversidad de los simbioses de *Medicago sativa* (Jenkins & Bottomley, 1985), *Pisum sativum* (Brockman & Bezdicek, 1989; Turco & Bezdicek, 1987), *Phaseolus* (Arredondo-Peter & Escamilla, 1993), *Arachis hypogea* (Kingsley & Ben Bohlool, 1983), *Glycine max* (Dowdle & Ben Bohlool, 1986; Meyer & Pueppke, 1980; Mpeperekí *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1988; Ramírez *et al.*, 1997), *Trifolium* (Glynn *et al.*, 1985; Hagedorn, 1979), *Vigna unguiculata* (Sinclair & Eaglesham, 1984) y varias leguminosas tropicales (Date & Hurse, 1991; Subramaniam & Babu, 1993).

La resistencia de los aislados a los antibióticos y concentraciones indicados en el correspondiente apartado de materiales y métodos, se muestra en la tabla 31 (figura 34).

Todas las cepas de referencia evaluadas simultáneamente con los aislados presentaron sensibilidad a la tetraciclina, ciprofloxacina y gentamicina. *Rhizobium tropici* IIB fue la única con resistencia a la polimixina B y a la neomicina, y, junto con *R. gallicum*, a la cefuroxima. *R. tropici* IIA fue el único sensible a la eritromicina. *R. leguminosarum* bv trifolii fue el sensible a la ampicilina. Todas las cepas de referencia presentaron resistencia a la cloxacilina y a la penicilina.

Todos los aislados de este estudio presentaron sensibilidad a la polimixina B, a la gentamicina, a la ciprofloxacina, a la neomicina y a la tetraciclina. En presencia de cefuroxima sólo hubo una ligera inhibición del crecimiento en el caso del aislado LET1912. Todos los aislados presentaron resistencia a la cloxacilina.

Se observó una baja sensibilidad de los aislados LCS0303, LCS0407, LEV0603, LEV0605, LEV0609 y LPZ0704 a la penicilina. Los aislados que presentaron resistencia a la penicilina fueron LEV0602, LPP0703, LPP0708, LBM1101, LBM1210, LPA1405, LPA1413, LET1901 y LET1912.

En lo que respecta a la eritromicina, 28 de los 51 aislados presentaron sensibilidad. Los aislados LPB0114, LCS0408, LEV0601, LEV0613, LEV0615, LPP0704, LPZ0914, LPA1403 y LPA1405 presentaron baja sensibilidad. Los aislados LET1901 y LET1912, LBM1210, LEV0614, LEV0602, LEV0603, LEV0605, LEV0607, LEV0609, LEV0612, LCS0411, LCS0305, LCS0306, LCS0308 y LCS0313 fueron resistentes a la eritromicina.

En el caso de la ampicilina, la mayoría de los aislados fue resistente. Sólo tres aislados presentaron una ligera sensibilidad (LCS0303, LPP0704 y LBM1101) y 10 aislados una clara sensibilidad (LCS0401, LCS0407, LEV0605, LPP0703, ZBM1005, LBM1123, LBM1209, LBM1210, LBM1212 y LPA1414).

Por lo tanto, la mayoría de los aislados presentaron idéntico patrón de resistencia a los antibióticos y sólo presentaron dos variaciones los aislados LCS0303, LCS0407, LEV0602, LEV0603, LEV0609, LPP0703, LBM1101, LPA1405 y LET1901.

Los aislados LEV0605, LPP0704, LBM1210 y LET1912 presentaron tres variaciones con respecto al patrón general de resistencia natural a los antibióticos utilizados en este estudio.

Tabla 31. Resistencia a antibióticos de los aislados

	<i>R. phaseolii</i>	<i>R. tropici</i> IA	<i>R. tropici</i> IB	<i>R. leguminosaru</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. pisi</i>	<i>R. gallicum</i>	<i>R. ellii</i>	<i>R. glandinii</i>	LPB0114	LPB0201	LPB0205	LPB0212	LCS0303	LCS0305	LCS0306	LCS0308	LCS0313	LCS0401	LCS0403	LCS0404	LCS0407	LCS0408	LCS0411	LEV0601	LEV0602	LEV0603	LEV0605
Polimixina B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilina	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicilina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroxima	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	d	-	+	+	+	+
Neomicina	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = crecimiento / - = inhibición / d = inhibición débil

Tabla 31. CONTINUACIÓN

	LEV0607	LEV0609	LEV0612	LEV0613	LEV0614	LEV0615	LPp0703	LPp0704	LPp0708	LPz0913	LPz0914	ZEM1005	ZEM1007	ZEM1008	LBM1101	LBM1113	LBM1123	LBM1209	LBM1210	LBM1212	LPA1403	LPA1405	LPA1410	LPA1413	LPA1414	LPA1417	LET1901	LET1912
Polimixina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicilina	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroxima	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	+	+	+	d	+	d	-	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	d	d	-	-	-	+	+
Neomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = crecimiento / - = inhibición / d = inhibición débil

4.3.3. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno

Dentro de los macroelementos considerados esenciales en la biología están el carbono y el nitrógeno. La determinación de la capacidad para metabolizar una serie de fuentes de C y N también es una fuente de información para evaluar su adaptabilidad a ambientes y es, a su vez, un reflejo de la biodiversidad de los aislados obtenidos, así como de las diferencias de adaptación a la rizosfera de la leguminosa o a los componentes orgánicos del suelo, con las consiguientes implicaciones ecológicas (Amarger, 2001).

En este trabajo se evaluó el crecimiento de los aislados en medio mínimo de Bergensen al que se le eliminó el manitol y se suplementó con 24 fuentes de C diferentes (14 azúcares, 5 polialcoholes y 5 ácidos orgánicos) y 11 fuentes de C y de N (9 aminoácidos y 2 aminoalcoholes).

En este trabajo se evaluó el crecimiento de los aislados en medio mínimo de Bergensen al que se le eliminó el manitol y se suplementó con 24 fuentes de C diferentes (14 azúcares, 5 polialcoholes y 5 ácidos orgánicos) y 11 fuentes de C y de N (9 aminoácidos y 2 aminoalcoholes).

La capacidad de metabolizar esos compuestos aparece reflejada en las tablas 32 (fuentes de C) y 33 (fuentes de C y N).

En general, se observa una gran capacidad en los aislados de este estudio para asimilar los azúcares como fuente de C, excepto en el caso de la melezitosa, que es un trisacárido, y no fue metabolizada por los aislados LBM1101, LBM1113, LBM1123, LBM1209 y LBM1210. Todos los aislados utilizaron la L-sorbosa como fuente de carbono, a diferencia de las cepas de referencia, que no fueron capaces de metabolizarla con la excepción de *Rhizobium giardinii*.

R. tropici IIA no fue capaz de metabolizar la rafinosa, la melibiosa, la salicina ni la L-sorbosa. *R. tropici* IIB, además de la L-sorbosa, no fue capaz de metabolizar la salicina. *R. leguminosarum* bv *trifolii* no creció en presencia de celobiosa ni de melibiosa, además de la L-sorbosa, como fuentes de C.

En cuanto a los polialcoholes, fueron metabolizados todos por todas las cepas de referencia excepto el mesoeritritol por *R. phaseoli* y *R. giardinii*, el D-sorbitol por *R. tropici* IIA y el xylitol por *R. tropici* IIB. De los aislados, el mesoeritritol no fue asimilado por algunos aislados, como LCS0411, LEV0602, LEV0603, LEV0612, LBM1101, LBM1113, LBM1123 y LBM1210.

De los ácidos orgánicos, el glucuronato resultó metabolizado por todos los aislados y las cepas de referencia. El piruvato no fue metabolizado por *R. etli* ni por el aislado LBM1113. El propionato fue asimilado solamente por las cepas de referencia, excepto *R. phaseoli* y *R. giardinii*.

Los ácidos orgánicos que presentaron asimilación variable fueron el gluconato y el citrato. El primero fue asimilado por todas las cepas de referencia, excepto *R. pisi* y *R. giardinii*, y por la mayoría de los aislados.

Los aminoalcoholes incluidos en el estudio fueron la sarcosina y la betaina. La betaina es empleada por todos los aislados así como las cepas de referencia, mientras que la sarcosina no fue metabolizada por 7 aislados, LPP0704, LPP0708, LBM1101, LBM1113, LBM1123, LBM1209 y LBM1212.

La L-prolina y el aspartato de magnesio son los únicos dos aminoácidos de los nueve evaluados que fueron metabolizados por todos los aislados y las cepas de referencia.

La L-serina fue empleada como fuente de C y N por la mayoría de los aislados, pero no por muchas de las cepas de referencia, como *R. tropici* IIA, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. pisi* y *R. etli*. Los aislados que no asimilaron la L-serina fueron LPB0201, LEV0602, LEV0603, LPP0703, LPP0704, LPP0708, LBM1209, LBM1212, LET1901 y LET1912. La DL-valina no fue metabolizada por ninguna de las cepas de referencia ni por 30 de los 51 aislados evaluados. La L-alanina no fue empleada por *R. tropici* IIA, *R. phaseoli* ni *R. trifolii*, así como por los 7 aislados LPB0212, LPZ0913, LPZ0914, LBM1113, LBM1123, LBM1209 y LBM1212. La L-arginina y L-lisina fueron metabolizadas por pocos aislados y pocas cepas de referencia. La L-lisina sólo fue metabolizada por *R. tropici* IIB y el aislado LCS0308. La L-arginina fue empleada por *R. pisi*, *R. gallicum*, *R. leguminosarum* y *R. tropici* IIB entre las cepas de referencia y por los aislados LPB0201, LPZ0913, LPB1101, LBM1209, LBM1210 y LET1912. La L-histidina fue mayoritariamente metabolizada, salvo por las cepas de referencia *R. tropici* IIA y *R. etli* y los aislados LPB0212, LCS0303, LPP0703, LPP0708, LBM1113, LBM1123, LBM1209, LBM1212 y LET1901. La asimilación de glutamato sódico mostró un perfil muy similar a la de la histidina, la sarcosina o la alanina, con resultados negativos en el caso de las dos cepas de referencia *R. tropici* IIA y *R. etli* y los aislados LPB0201, LPB0212, LCS0407, LBM1113, LBM1123, LBM1209 y LBM1212.

4.3.4. Producción de ureasa, celulasa y almidón

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea hasta obtener amonio y carbamato y éste es hidrolizado espontáneamente produciendo ácido carbónico y otra molécula de amonio, lo que hace subir el pH. Basándose en este principio se diseñó el caldo urea por Rustigian y Stuart (Rustigian & Stuart, 1941; Stuart *et al.*, 1945) y la ureasa es una prueba bioquímica fundamental en la taxonomía bacteriana para conocer la actividad enzimática de los aislados. La ureasa es una enzima producida habitualmente por rizobios de crecimiento rápido, aunque en algunos casos, el de *R. etli* CFN42^T, la hidrólisis de la urea es lenta y el cambio de color es inapreciable tras pocos días de incubación (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

La ureasa (tabla 34) fue positiva en 12 de los aislados de todos los suelos excepto de los suelos 10, 12 y 19, cuyos aislados no presentaron en ningún caso actividad ureasa (figura 34).

La celulosa y el almidón son dos moléculas muy abundantes en las células vegetales y en ambos casos son polímeros de glucosa. La celula es un polisacárido estructural de las células vegetales, mientras que el almidón es un polisacárido de reserva. Los rhizobia generalmente no producen amilasas, sin embargo se ha detectado la producción de celulasas más o menos activa en muchas especies (Robledo *et al.*, 2008).

La capacidad de los aislados para producir amilasas o celulasas se refleja en la tabla 34 (figura 34). La actividad amilasa tras siete días de incubación en medio con almidón como fuente de carbono fue negativa para la todos los aislados, así como para las cepas de referencia, lo que concuerda con los datos sobre la producción de este enzima por los rizobios en la literatura.

Aunque la producción de celulasas no fue abundante en ningún caso, la mayoría de los aislados (33 aislados de los 51) fueron capaces de hidrolizar carboximetil celulosa tras 7 días de incubación, representando todos los suelos con la excepción de los suelos 1 y 19. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Robledo *et al.* (2008) en cepas de diferentes especies del género *Rhizobium*.

4.3.5. Solubilización de fosfato

La solubilización de fosfato es llevada a cabo por algunas bacterias del suelo entre las que se incluyen los rizobios (Rodríguez & Fraga, 1999) y el fosfato solubilizado puede ser movilizado a las plantas contribuyendo a la promoción de su crecimiento (Chabot *et al.*; Peix *et al.*, 2001a, 2001b).

La solubilización de fosfato fue negativa en todos los aislados de este estudio excepto en el caso de la cepa LBM1210 (tabla 34, figura 34) que, como se vio en el apartado anterior, fue el que menor similitud presentó con respecto al resto de los aislados en cuanto a caracteres fenotípicos. Estudios llevados a cabo con rizobios con capacidad para solubilizar fosfato inorgánico han mostrado resultados diferentes. Rivas *et al.* (2007) y Ormeño *et al.* (2007) observaron un mayor desarrollo del *Cicer arietinum* L. y de *Phaseolus lunatus* L. inoculados con rizobios solubilizadores de fosfato, mientras que Rosas *et al.* (2007) observaron la alfalfa inoculada con *Sinorhizobium meliloti* solubilizadora de fosfato creció de forma similar al control abonado con N. En el caso de *Phaseolus vulgaris*, hay estudios con cepas que solubilizan fosfato con una eficiencia de fijación de N₂ similar a *R. etli* CFN42^T, considerada buena fijadora de N₂ (Abril *et al.*, 2007), con lo que sería necesaria la evaluación de este aislado en condiciones deficitarias de P soluble para la planta para conocer su habilidad como PGPR más allá de la fijación simbiótica de N₂.

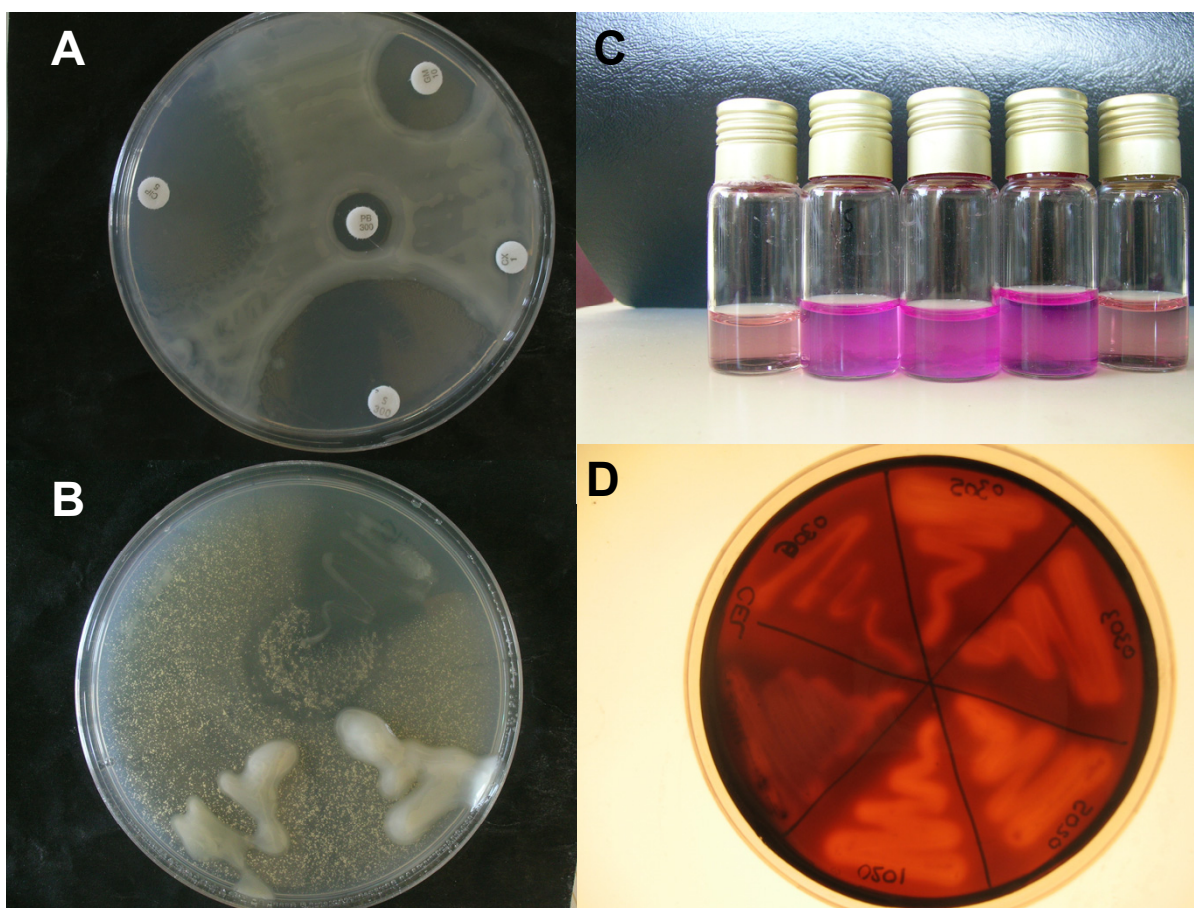


Figura 34. Pruebas fenotípicas de los aislados y las cepas de referencia: (A) resistencia o sensibilidad a antibióticos; (B) solubilización de Ca₂(PO₄)₃; (C) actividad ureasa; (D) actividad celulasa.

4.3.6. Otras actividades enzimáticas

La caracterización bioquímica de los aislados se completó con un ensayo de utilización de 32 sustratos derivados del paranitrofenol (PNP). Este tipo de sustratos se ha utilizado previamente en la caracterización de los rhizobia (Velázquez *et al.*, 2001a; Velázquez *et al.*, 2001b; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2004; Valverde *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2006; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) y en algunos casos han mostrado su utilidad para diferenciar entre especies del mismo género y por lo tanto para la descripción de especies, concretamente *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* y *R. pisi* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

La hidrólisis de dichos sustratos por las distintas cepas del estudio se muestra en la tabla 35. Todos los aislados fueron capaces de hidrolizar el PNP fosfato a pH 8,5, PNP- α -D-galactopiranosido, el PNP-N-acetil- α -D-galactosamínido, el PNP- α -D-glucopiranosido y el PNP- β -D-glucopiranosido. Sustratos como el PNP- α -D-galacturónido y el PNP- β -D-glucurónido no fueron hidrolizados por ninguno de los aislados. El resto de los sustratos de naturaleza glicosídica presentaron resultados variables.

Respecto a los sustratos de naturaleza no glicosídica, ningún aislado llevó a cabo la hidrólisis de PNP-hidrosuccinimida ni del PNP-sulfato. Todos los aislados hidrolizaron PNP-fosfato a pH 8,5 y el único que no hidrolizó PNP-bis-fosfato a pH 8,5 fue LBM1210. . La PNP-nitrofenil-fosforilcolina no fue hidrolizada por ningún aislado, aunque sí por las cepas de referencia de *Rhizobium leguminosarum*, *R. pisi*, *R. etli* y *R. giardinii*.

Las cepas que más diferencias presentaron frente al patrón mayoritario de hidrólisis de los distintos sustratos fueron LBM1210, LET1901, LET1912, LPA1414 y LEV0614.

4.3.7. Agrupamiento fenotípico

A partir de los datos obtenidos del fenotipado puede realizarse una comparación fenética, lo que significa que puede analizarse un gran número de caracteres independientes, obteniendo como resultado el grado de similitud de los organismos analizados. Este sistema de agrupamiento se conoce como Taxonomía Numérica (Sneath & Socal, 1973; Sneath, 2001). Siguiendo los principios de la Taxonomía Numérica, una vez obtenidos los resultados de pruebas fenotípicas, se realizó el agrupamiento de los aislados utilizando el método UPGMA y el dendrograma resultante (figura 35) muestra la diversidad fisiológica entre los aislados evaluados y las cepas de referencia.

Tabla 35. Otras actividades enzimáticas

	<i>R. phaseoli</i>	<i>R. tropici</i> I/A	<i>R. tropici</i> I/B	<i>R. leguminis</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. pisi</i>	<i>R. gallicum</i>	<i>R. elii</i>	<i>R. ginsengii</i>	LPB0114	LPB0201	LPB0205	LPB0212	LCS0303	LCS0305	LCS0306	LCS0308	LCS0313	LCS0401	LCS0403	LCS0404	LCS0407	LCS0408	LCS0411	LEV0601	LEV0602	LEV0603	LEV0605
Acetato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-hidrosuccinimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-N-acetil-β-D-galactosamínido	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	d	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
PNP-N-acetil-α-D-galactosamínido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-α-L-arabinopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
PNP-β-L-arabinopiranosido	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	d	+	+	-	+	+	+	+
PNP-β-D-celobiosido	-	-	+	+	-	+	-	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-D-fenilalanina	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-fosfato pH 5,-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	d	+	+	-	-	d	+	+	+	+	+	-	-	d	d	+
PNP-fosfato pH 7,-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	d	d	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	-	d	-	d	d
PNP-fosfato pH 8,5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	d	+	+
PNP-bis-fosfato pH 7,-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
PNP-bis-fosfato pH 8,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-nitrofenil fosforilcolina	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-α-L-fucopiranosido	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-β-D-fucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-α-D-galactopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-β-D-galactopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-α-D-galacturónido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-α-D-glucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-β-D-glucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-β-D-glucurónido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-β-D-lactopiranosido	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-α-D-maltopiranosido	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-β-D-maltopiranosido	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-α-D-manopiranosido	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-β-D-manopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	-	-	d	d	+	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	d	-
PNP-α-L-ramnopiranosido	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNP-sulfato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-tioglucopiranosido	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-α-D-xilopiranosido	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNP-β-D-xilopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	d	+	-	d	-	-	-	-	+	-	d	-	d	d

+ → hidrólisis del sustrato, d → hidrólisis débil, - → no hidrólisis

Tabla 35. CONTINUACIÓN

	LEV0607	LEV0609	LEV0612	LEV0613	LEV0614	LEV0615	LPZ0703	LPZ0704	LPZ0708	LPZ0913	LPZ0914	ZBM1005	ZBM1007	ZBM1008	LBM1101	LBM1113	LBM1123	LBM1209	LBM1210	LBM1212	LPA1403	LPA1405	LPA1410	LPA1413	LPA1414	LPA1417	LET1901	LET1912		
Acetato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
PNP-hidrosuccinimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PNP-N-acetil-β-D-galactosamínido	+	-	d	d	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	+		
PNP-N-acetil-α-D-galactosamínido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-α-L-arabinopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	
PNP-β-L-arabinopiranosido	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-β-D-celobiosido	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PNP-D-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
PNP-fosfato pH 5,-	-	+	-	+	+	d	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PNP-fosfato pH 7,-	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	-	d	d	d	d	d	d	d	d	+	d	
PNP-fosfato pH 8,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-bis-fosfato pH 7,-	-	-	-	-	d	-	-	-	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	
PNP-bis-fosfato pH 8,5	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-nitrofenil fosforilcolina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PNP-α-L-fucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-β-D-fucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-α-D-galactopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-β-D-galactopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-α-D-galacturónido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PNP-α-D-glucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-β-D-glucopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PNP-β-D-glucurónido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PNP-β-D-lactopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	
PNP-α-D-maltopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	+	
PNP-β-D-maltopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
PNP-α-D-manopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PNP-β-D-manopiranosido	+	-	-	+	-	-	-	-	+	d	-	-	-	d	d	-	-	d	-	+	-	-	d	d	d	-	-	-	-	
PNP-α-L-ramnopiranosido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PNP-sulfato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PNP-tiogluconopiranosido	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	
PNP-α-D-xilopiranosido	-	-	+	+	+	-	+	+	+	d	-	-	d	d	d	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	d	-	+	+	
PNP-β-D-xilopiranosido	+	d	+	+	+	-	+	+	+	d	d	d	d	d	d	+	d	-	-	d	-	d	d	d	d	-	-	+	+	

+ → hidrólisis del sustrato, d → hidrólisis débil, - → no hidrólisis

De acuerdo con los resultados obtenidos tras el análisis matemático de los resultados, las cepas *Rhizobium phaseoli*, *R. leguminosarum* bv trifolii, *R. leguminosarum* bv viciae y *R. etli* formaron un grupo con un coeficiente de similitud superior al 75%, lo que da idea de la proximidad fenotípica de estas especies que también son próximas desde un punto de vista filogenético (Ramírez-Bahena et al., 2008). Las cepas *R. tropici* IIB CIAT 899^T y *R. gallicum* R602sp^T presentaron mayor disimilitud, pero se agruparon también con las cepas anteriores. *R. giardinii* se agrupó en un cluster bien diferenciado con las cepas LET1901 y LET1912 que fueron clasificadas en esta especie en base a características genotípicas. La cepa de referencia más distante fenotípicamente fue *R. tropici* IIA con una similitud próxima al 50%.

Los aislados filogenéticamente próximos a *R. leguminosarum* presentaron una similitud fenotípica mayor entre ellos que con las cepas de referencia. El aislado más distante de todos los demás así como de las cepas de referencia es LBM1210 aislado en Miñambres de la Valduerna. Los aislados de Pobladura de Pelayo García presentaron una relativamente alta disimilitud con los de la misma comarca y formaron un grupo aislado que incluyó las cepas LPP0703, LPP0704 y LPP0708.

A pesar de que algunas cepas aisladas en la misma comarca, como ocurre en el caso de los aislados de Miñambres de la Valduerna y Pobladura de Pelayo García formaron grupos independientes (grupos B y C), la mayoría de las cepas aparecen mezcladas en los diferentes grupos fenotípicos. Estos resultados indican que, aunque se pueden diferenciar genotípicamente varios grupos dentro de los aislados próximos a *R. leguminosarum* que podrían constituir nuevas especies, la diferenciación fenotípica entre los mismos es difícil.

El elevado grado de similitud de algunos aislados (por encima del 80%) de diferentes orígenes y la no concordancia de la agrupación fenotípica con la agrupación genética parece indicar que la adaptación de los aislados a las condiciones ambientales de la región los hace próximos fenéticamente, mientras que los separa de las especies próximas filogenéticamente que provienen de condiciones ambientales diferentes. Un caso similar ocurrió en el estudio de los aislados de *Bradyrhizbium* sp. analizados por Yang et al., 2005, donde se muestra que la similitud entre los aislados del estudio es mayor que con las cepas de referencia del género *Bradyrhizobium*.

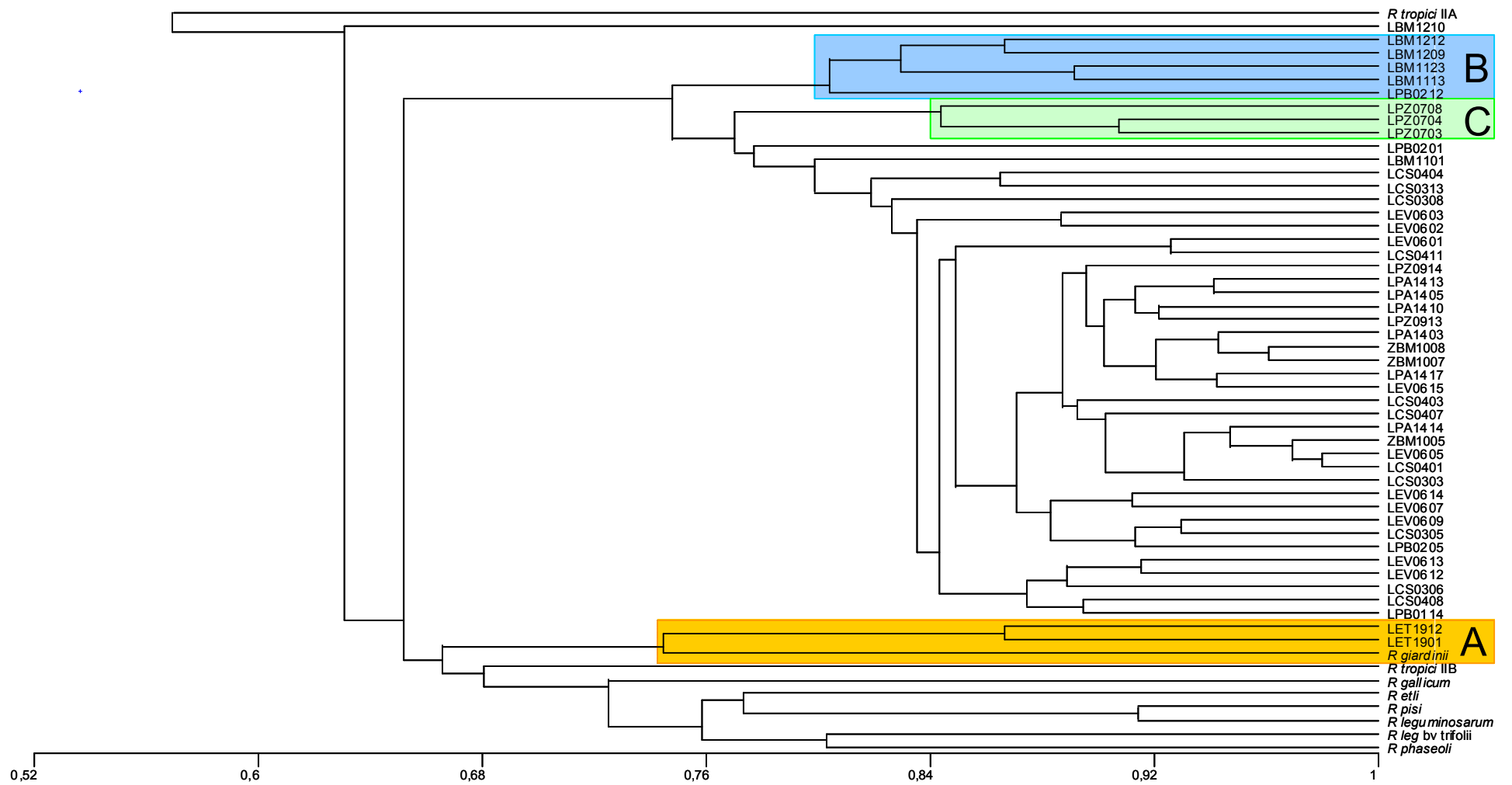


Figura 35. Dendrograma resultante del agrupamiento fenotípico.

4.4. Infectividad y eficiencia de fijación de N₂ en medio hidropónico estéril

La infectividad y eficiencia de fijación de N₂ de los aislados se evaluó en la cámara de crecimiento frente a controles no inoculados a los que se les proporcionó la misma solución nutritiva libre de N (control sin N, NN), y solución nutritiva con N en forma de nitrato amónico (control con N, NQ). La infectividad de los aislados bacterianos inoculados en las plantas se evaluó mediante la observación de la presencia o ausencia de nódulos en la raíz de las plantas inoculadas. Todos los aislados del estudio produjeron nódulos radiculares, con lo que quedó probada su infectividad.

La primera fase del análisis de eficiencia incluyó a 48 aislados, a los que se determinó el contenido en N, P, K, Ca y Mg en la biomasa aérea. Los 18 aislados de mayor eficiencia se pasaron de nuevo por la cámara de crecimiento para hacer una segunda selección a fin de determinar los aislados que se utilizaron en el experimento de microcosmos.

4.4.1. Estudio de la eficiencia de fijación de N₂ de 48 aislados bacterianos

La tabla 36 muestra el ANOVA para las variables dependientes biomasa aérea, biomasa subterránea y masa de nódulos, así como el porcentaje de N y el contenido total en la biomasa aérea de N, P, K, Ca y Mg, existiendo diferencias significativas entre tratamientos para todas ellas ($p < 0,001$). La variable independiente fue el tratamiento de inoculación, que comprendió los 48 aislados bacterianos y 6 controles no inoculados.

En las tablas 37 y 38 se presenta la comparación de los valores medios de las variables dependientes para los tratamientos inoculados y los controles. La tabla 37 está ordenada de mayor a menor contenido total de N. Para cada variable se señala en fondo sombreado el valor más elevado. La tabla 38 está ordenada de menor a mayor contenido total de N. Para cada variable se señala en fondo sombreado el valor mínimo. Los asteriscos indican el nivel de significación de las diferencias frente al valor máximo (tabla 37) o al valor mínimo (tabla 38), con la prueba *post hoc* de la mínima diferencia significativa (DMS, $p < 0,05$).

Tabla 36. ANOVA de las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en cultivo hidropónico para los tratamientos de inoculación con 48 aislados y los controles sin inocular con y sin N

Variable	Suma cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p
Biomasa aérea	2,925 10 ⁷	53	551802,543	7,635	0,000
Biomasa subterránea	2614615,194	53	49332,362	15,879	0,000
Masa de nódulos	1598356,724	53	86761,448	2,826	0,000
N (%) en biomasa aérea	400,198	53	7,551	93,799	0,000
N total en biomasa aérea	73191,360	53	1380,969	16,794	0,000
P total en biomasa aérea	544,992	53	10,283	7,381	0,000
K total en biomasa aérea	41583,155	53	784,588	17,026	0,000
Ca total en biomasa aérea	665,258	53	12,552	20,237	0,000
Mg total en biomasa aérea	3384,486	53	63,858	11,495	0,000

Tabla .37. Valores medios de las variables dependientes del experimento de alubia Riñón en cultivo hidropónico para los tratamientos de inoculación y su comparación con el valor más elevado de cada variable dependiente (en negrita, prueba DMS) La tabla está ordenada de mayor a menor valor de contenido total de N en la biomasa aérea.

Inóculo	N total		P total		K total		Ca total		Mg total						
	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip					
LCS0306	46,43	18,04	4,94	1,58	--	44,93	17,61	2,42	1,29	***	8,71	3,67	***		
LCS0313	41,62	13,99	--	4,88	1,68	--	29,13	8,76	***	2,15	0,67	***	7,77	2,60	***
LPB0114	41,60	10,58	--	5,31	0,94	--	22,86	3,92	***	2,38	0,42	***	8,42	1,70	***
LBM1210	39,66	10,32	*	4,34	1,06	*	17,94	4,36	***	1,90	0,49	***	7,61	1,79	***
LBM1101	38,94	8,59	*	3,01	0,67	***	21,80	5,12	***	2,43	0,62	***	6,90	1,55	***
LCS0404	38,52	9,62	*	4,24	1,04	***	29,93	7,18	***	2,32	0,76	***	6,76	1,75	***
LPB0205	38,26	8,27	*	5,19	2,03	--	25,45	7,23	***	2,50	0,68	***	11,91	3,55	--
LEV0613	37,86	7,52	*	4,39	0,87	*	25,32	4,98	***	1,60	0,31	***	6,37	1,21	***
LCS0403	37,57	17,88	**	4,01	2,06	**	29,27	15,86	***	1,75	0,94	***	6,37	3,29	***
ZBM1008	37,40	11,16	**	3,50	1,08	***	19,45	5,67	***	2,31	0,74	***	7,16	1,83	***
LCS0308	37,26	12,42	**	4,35	1,13	*	26,12	7,13	***	2,52	1,10	***	10,82	3,94	*
LCS0411	37,17	10,14	**	4,33	1,09	*	22,74	6,04	***	2,38	0,61	***	9,75	2,51	***
LPB0212	36,92	9,36	**	4,85	1,53	--	19,84	5,20	***	2,15	0,76	***	10,16	2,61	**
LPB0201	36,65	9,38	**	4,17	1,07	**	26,97	7,03	***	1,72	0,44	***	7,18	1,84	***
LCS0407	36,10	13,88	**	3,32	1,20	***	36,07	13,08	***	6,51	2,48	***	12,65	4,96	***
LCS0303	35,83	6,59	**	4,42	0,94	*	24,36	4,55	***	2,63	1,03	***	10,98	1,96	--
LPZ0913	35,25	6,78	***	3,41	0,65	***	23,76	4,77	***	1,89	0,43	***	3,73	0,73	***
LBM1123	35,18	14,78	***	4,42	1,87	*	24,09	12,03	***	1,58	0,68	***	7,63	3,44	***
LEV0602	34,87	8,87	***	4,51	1,30	*	16,54	4,38	***	1,58	0,42	***	10,39	3,00	**
LCS0401	34,70	10,97	***	3,23	0,88	***	17,78	4,82	***	2,86	1,05	***	9,81	2,69	**
LBM1209	34,43	14,06	***	4,10	1,64	**	21,98	8,59	***	2,39	1,32	***	7,20	2,81	***
LEV0614	34,02	9,46	***	5,42	1,70		19,18	5,88	***	1,92	0,62	***	9,16	2,53	***
LEV0605	32,86	7,12	***	4,36	0,96	*	21,78	4,52	***	1,75	0,47	***	6,71	1,43	***
LEV0615	31,72	7,81	***	4,11	1,17	**	17,64	4,58	***	1,62	0,52	***	7,01	1,96	***
LBM1212	31,35	8,24	***	4,61	1,46	--	19,36	5,60	***	1,86	0,60	***	7,44	2,04	***
LEV0607	31,05	7,57	***	4,14	0,99	**	14,44	3,30	***	1,56	0,52	***	8,49	2,21	***
LEV0603	30,60	6,25	***	4,11	1,02	**	17,44	3,58	***	1,98	0,50	***	9,80	2,07	***
LEV0601	29,57	7,69	***	4,13	1,08	**	14,97	3,93	***	1,56	0,51	***	8,81	2,44	***
ZBM1007	28,32	13,95	***	2,88	1,62	***	12,27	6,00	***	1,44	0,69	***	5,71	2,78	***
LPP0708	28,25	5,96	***	3,76	0,96	***	14,87	3,32	***	1,22	0,27	***	5,79	1,19	***
LEV0609	28,01	6,57	***	3,77	0,97	***	16,22	4,06	***	1,38	0,50	***	6,98	1,93	***
LET1912	27,80	6,61	***	2,60	0,70	***	22,58	5,73	***	4,14	1,00	***	8,20	2,05	***
LPA1417	27,25	6,10	***	4,00	0,98	**	21,18	5,02	***	3,27	0,71	***	9,65	2,13	***
LPA1414	26,85	5,39	***	5,04	1,80	--	31,30	12,90	***	4,27	1,05	***	11,64	4,29	--
LPB0111	26,83	5,46	***	3,49	0,74	***	27,08	5,90	***	1,93	0,47	***	6,59	1,34	***
LPZ0914	26,81	9,66	***	4,15	1,44	**	15,00	5,17	***	1,35	0,51	***	3,82	1,36	***
LCS0408	26,58	10,40	***	3,18	1,32	***	23,93	8,39	***	1,61	0,67	***	5,56	1,91	***
LPP0704	26,44	6,67	***	2,75	0,79	***	15,89	3,90	***	1,41	0,30	***	6,04	1,64	***
LPP0703	25,80	6,69	***	3,75	0,58	***	15,82	2,60	***	1,82	0,41	***	4,76	0,93	***
LBM1113	24,17	9,03	***	4,00	1,30	**	13,54	4,44	***	1,41	0,46	***	6,37	2,16	***
LCS0305	23,36	10,68	***	3,63	1,64	***	26,81	11,87	***	1,62	0,73	***	5,93	2,74	***
LEV0612	23,29	6,12	***	3,94	1,05	***	24,24	5,86	***	1,51	0,34	***	7,27	1,68	***
LPA1410	19,43	5,57	***	3,02	1,01	***	15,85	4,87	***	2,53	0,90	***	5,97	1,91	***
LPA1403	19,35	2,86	***	3,30	0,57	***	12,84	1,96	***	1,55	0,29	***	7,56	1,12	***
ZBM1005	18,77	8,04	***	2,63	0,75	***	9,70	2,77	***	1,17	0,32	***	5,20	1,36	***
LPA1413	15,21	2,89	***	2,90	0,56	***	12,96	2,42	***	1,51	0,31	***	5,97	1,08	***
LPA1405	14,06	2,07	***	3,61	0,51	***	9,76	2,02	***	1,27	0,21	***	7,95	1,13	***
LET1901	11,32	3,02	***	2,96	0,83	***	6,59	1,67	***	0,80	0,21	***	7,59	2,01	***
NNgh	9,51	1,72	***	2,42	0,63	***	15,47	2,94	***	2,64	0,80	***	7,41	1,41	***
NNd	8,64	1,42	***	4,12	0,54	**	7,63	1,23	***	1,73	0,29	***	4,21	0,54	***
NNc	8,12	3,44	***	0,03	0,01	***	0,03	0,01	***	-	-	***	0,02	0,01	***
Nnef	7,69	1,93	***	2,86	0,72	***	16,73	4,19	***	3,45	0,86	***	9,46	2,37	*
NNb	7,53	4,05	***	2,42	1,25	***	15,34	8,87	***	2,47	1,95	***	7,88	4,30	***
Nna	7,27	1,52	***	2,29	0,69	***	11,86	2,90	***	2,68	0,93	***	7,89	1,63	***

*** $p < 0,001$; ** para p entre 0,001 y 0,01; * para p entre 0,01 y 0,05 (prueba DMS)

Tabla 37. CONTINUACIÓN

Inóculo	Biomasa aérea		Biomasa subterránea		Masa de nódulos			N%				
	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip				
LCS0306	1384,92	541,13		687,01	334,22	--	176,56	79,49	*	3,35	0,33	***
LCS0313	1241,87	388,80	--	615,71	254,90	*	203,31	76,47	--	3,35	0,28	***
LPB0114	1147,48	213,45	*	572,97	143,14	**	191,08	54,53	--	3,59	0,41	***
LBM1210	1098,23	271,71	**	556,20	147,61	**	161,37	59,63	**	3,60	0,14	***
LBM1101	1059,39	253,35	**	515,60	117,59	***	157,02	49,80	**	3,70	0,29	***
LCS0404	1159,09	278,03	*	660,64	202,74	--	165,06	53,71	**	3,33	0,32	***
LPB0205	1131,27	247,62	*	600,79	149,75	*	211,70	49,90	--	3,39	0,35	***
LEV0613	936,37	182,22	***	506,43	130,39	***	150,53	40,12	***	4,05	0,23	--
LCS0403	1125,67	554,26	**	622,61	322,02	*	176,25	123,05	*	3,38	0,51	***
ZBM1008	1078,87	291,07	**	629,86	173,68	*	144,69	45,69	***	3,45	0,21	***
LCS0308	1079,07	275,36	**	543,30	201,12	***	171,71	63,99	*	3,41	0,56	***
LCS0411	1000,27	271,33	***	621,79	267,09	*	183,07	62,37	--	3,71	0,04	**
LPB0212	1002,73	260,67	***	551,27	128,99	***	189,42	64,31	--	3,69	0,13	***
LPB0201	1025,96	268,60	***	520,45	114,48	***	183,65	54,06	--	3,59	0,19	***
LCS0407	1203,25	443,21	--	988,34	178,55		190,79	74,35	--	3,01	0,33	***
LCS0303	1061,31	194,31	**	576,16	130,59	**	218,05	71,46	--	3,38	0,03	***
LPZ0913	885,75	173,42	***	670,63	161,68	--	215,47	33,74	--	3,98	0,06	--
LBM1123	1033,78	438,03	***	543,30	201,52	***	137,95	74,19	***	3,41	0,05	***
LEV0602	883,45	226,09	***	581,45	185,18	**	156,91	75,39	**	3,95	0,05	--
LCS0401	1076,94	296,50	**	552,96	162,03	**	165,33	56,65	**	3,20	0,37	***
LBM1209	1133,23	452,64	*	599,41	238,15	**	198,68	90,22	--	3,04	0,11	***
LEV0614	920,35	251,80	***	565,82	164,71	**	166,39	54,36	**	3,74	0,66	**
LEV0605	827,64	178,80	***	521,33	148,88	***	117,07	38,25	***	3,97	0,09	--
LEV0615	801,39	215,98	***	494,53	137,49	***	126,91	42,37	***	3,99	0,37	--
LBM1212	1134,28	320,69	*	669,08	152,72	--	205,53	54,50	--	2,78	0,14	***
LEV0607	772,72	178,94	***	513,98	152,17	***	106,16	32,74	***	4,05	0,10	
LEV0603	937,45	195,58	***	683,67	200,01	--	157,56	48,61	**	3,27	0,20	***
LEV0601	819,93	213,23	***	608,62	205,53	*	155,35	62,88	**	3,61	0,00	***
ZBM1007	753,53	361,27	***	602,01	186,16	*	222,41	41,03		3,71	0,30	**
LPP0708	803,77	173,61	***	573,67	129,31	**	162,72	50,36	**	3,52	0,08	***
LEV0609	765,26	191,74	***	562,07	129,23	**	164,05	51,31	**	3,68	0,22	***
LET1912	825,94	197,72	***	524,22	121,64	***	109,37	36,21	***	3,37	0,04	***
LPA1417	841,83	186,56	***	482,78	113,15	***	130,61	47,74	***	3,24	0,13	***
LPA1414	751,79	133,79	***	481,15	100,84	***	103,79	30,09	***	3,56	0,24	***
LPB0111	901,96	189,78	***	482,88	65,90	***	139,31	42,69	***	2,98	0,11	***
LPZ0914	855,05	290,03	***	629,80	210,55	*	182,61	50,22	--	3,14	0,26	***
LCS0408	1005,69	348,46	***	601,29	274,78	*	147,33	58,73	***	2,65	0,33	***
LPP0704	901,91	203,67	***	648,60	113,90	--	156,45	33,54	**	2,93	0,19	***
LPP0703	854,73	140,45	***	607,18	144,28	*	177,25	32,85	*	2,99	0,40	***
LBM1113	871,01	282,31	***	533,52	164,86	***	117,57	54,76	***	2,80	0,56	***
LCS0305	833,09	364,72	***	439,62	280,93	***	126,47	83,77	***	2,79	0,19	***
LEV0612	842,38	200,09	***	571,91	162,20	**	131,16	51,22	***	2,75	0,18	***
LPA1410	679,71	193,34	***	485,57	116,48	***	111,46	43,30	***	2,86	0,07	***
LPA1403	647,21	95,64	***	512,65	91,76	***	144,68	27,99	***	2,99	0,04	***
ZBM1005	728,79	187,15	***	517,69	109,00	***	131,24	59,49	***	2,51	0,68	***
LPA1413	577,18	108,91	***	434,29	108,46	***	-	-	***	2,64	0,06	***
LPA1405	553,12	80,71	***	436,38	75,95	***	109,22	39,85	***	2,54	0,04	***
LET1901	566,44	144,79	***	468,93	113,81	***	101,42	32,83	***	2,00	0,08	***
NNgh	577,32	112,94	***	476,15	117,93	***	-	-	***	1,65	0,10	***
NNd	601,29	77,88	***	446,88	97,07	***	-	-	***	1,44	0,20	***
NNc	599,38	253,83	***	437,60	121,83	***	-	-	***	1,36	-	***
Nnef	710,83	177,99	***	487,15	103,62	**	-	-	***	1,08	-	***
NNb	666,33	362,48	***	445,76	162,60	***	-	-	***	1,13	0,03	***
Nna	674,09	146,23	***	402,86	95,59	***	-	-	***	1,08	0,03	***

*** $p < 0,001$; ** para p entre 0,001 y 0,01; * para p entre 0,01 y 0,05 (prueba DMS)

Tabla 38. Valores medios de las variables dependientes del experimento de alubia Riñón en cultivo hidropónico para los tratamientos de inoculación y su comparación con el valor más reducido de cada variable dependiente (en negrita, prueba DMS) La tabla está ordenada de menor a mayor valor de contenido total de N en la biomasa aérea.

Inóculo	N total		P total		K total		Ca total		Mg total	
	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip
NNa	7,27	1,52	2,29	0,69	11,86	2,90 *	2,68	0,93 ***	7,89	1,63 ***
NNb	7,53	4,05 --	2,42	1,25 --	15,34	8,87 ***	2,47	1,95 ***	7,88	4,30 ***
NNef	7,69	1,93 --	2,86	0,72 --	16,73	4,19 **	3,45	0,86 ***	9,46	2,37 ***
NNc	8,12	3,44 --	0,03	0,01 ***	0,03	0,01 --	-	- *	0,02	0,01 **
NNd	8,64	1,42 --	4,12	0,54 ***	7,63	1,23 --	1,73	0,29 **	4,21	0,54 --
NNgh	9,51	1,72 --	2,42	0,63 --	15,47	2,94 ***	2,64	0,80 ***	7,41	1,41 ***
LET1901	11,32	3,02 --	2,96	0,83 --	6,59	1,67	0,80	0,21	7,59	2,01 ***
LPA1405	14,06	2,07 *	3,61	0,51 **	9,76	2,02 --	1,27	0,21 --	7,95	1,13 ***
LPA1413	15,21	2,89 *	2,90	0,56 --	12,96	2,42 *	1,51	0,31 *	5,97	1,08 **
ZBM1005	18,77	8,04 ***	2,63	0,75 --	9,70	2,77 --	1,17	0,32 --	5,20	1,36 --
LPA1403	19,35	2,86 ***	3,30	0,57 *	12,84	1,96 *	1,55	0,29 **	7,56	1,12 ***
LPA1410	19,43	5,57 ***	3,02	1,01 --	15,85	4,87 ***	2,53	0,90 ***	5,97	1,91 **
LEV0612	23,29	6,12 ***	3,94	1,05 ***	24,24	5,86 ***	1,51	0,34 *	7,27	1,68 ***
LCS0305	23,36	10,68 ***	3,63	1,64 **	26,81	11,87 ***	1,62	0,73 **	5,93	2,74 *
LBM1113	24,17	9,03 ***	4,00	1,30 ***	13,54	4,44 **	1,41	0,46 *	6,37	2,16 **
LPP0703	25,80	6,69 ***	3,75	0,58 ***	15,82	2,60 ***	1,82	0,41 ***	4,76	0,93 --
LPP0704	26,44	6,67 ***	2,75	0,79 --	15,89	3,90 ***	1,41	0,30 *	6,04	1,64 **
LCS0408	26,58	10,40 ***	3,18	1,32 *	23,93	8,39 ***	1,61	0,67 **	5,56	1,91 *
LPZ0914	26,81	9,66 ***	4,15	1,44 ***	15,00	5,17 ***	1,35	0,51 --	3,82	1,36 --
LPB0111	26,83	5,46 ***	3,49	0,74 **	27,08	5,90 ***	1,93	0,47 ***	6,59	1,34 ***
LPA1414	26,85	5,39 ***	5,04	1,80 ***	31,30	12,90 ***	4,27	1,05 ***	11,64	4,29 ***
LPA1417	27,25	6,10 ***	4,00	0,98 ***	21,18	5,02 ***	3,27	0,71 ***	9,65	2,13 ***
LET1912	27,80	6,61 ***	2,60	0,70 --	22,58	5,73 ***	4,14	1,00 ***	8,20	2,05 ***
LEV0609	28,01	6,57 ***	3,77	0,97 ***	16,22	4,06 ***	1,38	0,50 *	6,98	1,93 ***
LPP0708	28,25	5,96 ***	3,76	0,96 ***	14,87	3,32 ***	1,22	0,27 --	5,79	1,19 *
ZBM1007	28,32	13,95 ***	2,88	1,62 --	12,27	6,00 *	1,44	0,69 *	5,71	2,78 *
LEV0601	29,57	7,69 ***	4,13	1,08 ***	14,97	3,93 ***	1,56	0,51 **	8,81	2,44 ***
LEV0603	30,60	6,25 ***	4,11	1,02 ***	17,44	3,58 ***	1,98	0,50 ***	9,80	2,07 ***
LEV0607	31,05	7,57 ***	4,14	0,99 ***	14,44	3,30 **	1,56	0,52 **	8,49	2,21 ***
LBM1212	31,35	8,24 ***	4,61	1,46 ***	19,36	5,60 ***	1,86	0,60 ***	7,44	2,04 ***
LEV0615	31,72	7,81 ***	4,11	1,17 ***	17,64	4,58 ***	1,62	0,52 **	7,01	1,96 ***
LEV0605	32,86	7,12 ***	4,36	0,96 ***	21,78	4,52 ***	1,75	0,47 **	6,71	1,43 ***
LEV0614	34,02	9,46 ***	5,42	1,70 ***	19,18	5,88 ***	1,92	0,62 ***	9,16	2,53 ***
LBM1209	34,43	14,06 ***	4,10	1,64 ***	21,98	8,59 ***	2,39	1,32 ***	7,20	2,81 ***
LCS0401	34,70	10,97 ***	3,23	0,88 *	17,78	4,82 ***	2,86	1,05 ***	9,81	2,69 ***
LEV0602	34,87	8,87 ***	4,51	1,30 ***	16,54	4,38 ***	1,58	0,42 **	10,39	3,00 ***
LBM1123	35,18	14,78 ***	4,42	1,87 ***	24,09	12,03 ***	1,58	0,68 **	7,63	3,44 ***
LPZ0913	35,25	6,78 ***	3,41	0,65 **	23,76	4,77 ***	1,89	0,43 ***	3,73	0,73
LCS0303	35,83	6,59 ***	4,42	0,94 ***	24,36	4,55 ***	2,63	1,03 ***	10,98	1,96 ***
LCS0407	36,10	13,88 ***	3,32	1,20 *	36,07	13,08 ***	6,51	2,48 ***	12,65	4,96 ***
LPB0201	36,65	9,38 ***	4,17	1,07 ***	26,97	7,03 ***	1,72	0,44 **	7,18	1,84 ***
LPB0212	36,92	9,36 ***	4,85	1,53 ***	19,84	5,20 ***	2,15	0,76 ***	10,16	2,61 ***
LCS0411	37,17	10,14 ***	4,33	1,09 ***	22,74	6,04 ***	2,38	0,61 ***	9,75	2,51 ***
LCS0308	37,26	12,42 ***	4,35	1,13 ***	26,12	7,13 ***	2,52	1,10 ***	10,82	3,94 ***
ZBM1008	37,40	11,16 ***	3,50	1,08 **	19,45	5,67 ***	2,31	0,74 ***	7,16	1,83 ***
LCS0403	37,57	17,88 ***	4,01	2,06 ***	29,27	15,86 ***	1,75	0,94 **	6,37	3,29 **
LEV0613	37,86	7,52 ***	4,39	0,87 ***	25,32	4,98 ***	1,60	0,31 **	6,37	1,21 **
LBM0205	38,26	8,27 ***	5,19	2,03 ***	25,45	7,23 ***	2,50	0,68 ***	11,91	3,55 ***
LCS0404	38,52	9,62 ***	4,24	1,04 ***	29,93	7,18 ***	2,32	0,76 ***	6,76	1,75 ***
LBM1101	38,94	8,59 ***	3,01	0,67 --	21,80	5,12 ***	2,43	0,62 ***	6,90	1,55 ***
LBM1210	39,66	10,32 ***	4,34	1,06 ***	17,94	4,36 ***	1,90	0,49 ***	7,61	1,79 ***
LPB0114	41,60	10,58 ***	5,31	0,94 ***	22,86	3,92 ***	2,38	0,42 ***	8,42	1,70 ***
LCS0313	41,62	13,99 ***	4,88	1,68 ***	29,13	8,76 ***	2,15	0,67 ***	7,77	2,60 ***
LCS0306	46,43	18,04 ***	4,94	1,58 ***	44,93	17,61 ***	2,42	1,29 ***	8,71	3,67 ***

*** $p < 0,001$; ** para p entre 0,001 y 0,01; * para p entre 0,01 y 0,05 (prueba DMS)

Tabla 38. CONTINUACIÓN

Inóculo	Biomasa aérea		Biomasa subterránea		Masa de nódulos		N%			
	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip	Media	Desvtip		
NNa	674,09	146,23	--	402,86	95,59	--	-	***	1,08	0,03
NNb	666,33	362,48	--	445,76	162,60	--	-	***	1,13	0,03
NNef	710,83	177,99	--	487,15	103,62	--	-	**	1,08	-
NNc	599,38	253,83	--	437,60	121,83	--	-	***	1,36	-
NNd	601,29	77,88	--	446,88	97,07	--	-	***	1,44	0,20
NNgh	577,32	112,94	--	476,15	117,93	--	-	***	1,65	0,10
LET1901	566,44	144,79	--	468,93	113,81	--	101,42	32,83	2,00	0,08
LPA1405	553,12	80,71	--	436,38	75,95	--	109,22	39,85	2,54	0,04
LPA1413	577,18	108,91	--	434,29	108,46	--	-	***	2,64	0,06
ZBM1005	728,79	187,15	--	517,69	109,00	--	131,24	59,49	2,51	0,68
LPA1403	647,21	95,64	--	512,65	91,76	--	144,68	27,99	2,99	0,04
LPA1410	679,71	193,34	--	485,57	116,48	--	111,46	43,30	2,86	0,07
LEV0612	842,38	200,09	**	571,91	162,20	**	131,16	51,22	2,75	0,18
LCS0305	833,09	364,72	**	439,62	280,93	--	126,47	83,77	2,79	0,19
LBM1113	871,01	282,31	**	533,52	164,86	*	117,57	54,76	2,80	0,56
LPP0703	854,73	140,45	**	607,18	144,28	**	177,25	32,85	2,99	0,40
LPP0704	901,91	203,67	***	648,60	113,90	***	156,45	33,54	2,93	0,19
LCS0408	1.005,69	348,46	***	601,29	274,78	**	147,33	58,73	2,65	0,33
LPZ0914	855,05	290,03	**	629,80	210,55	***	182,61	50,22	3,14	0,26
LPB0111	901,96	189,78	***	482,88	65,90	--	139,31	42,69	2,98	0,11
LPA1414	751,79	133,79	*	481,15	100,84	--	103,79	30,09	3,56	0,24
LPA1417	841,83	186,56	**	482,78	113,15	--	130,61	47,74	3,24	0,13
LET1912	825,94	197,72	**	524,22	121,64	--	109,37	36,21	3,37	0,04
LEV0609	765,26	191,74	*	562,07	129,23	*	164,05	51,31	3,68	0,22
LPP0708	803,77	173,61	*	573,67	129,31	**	162,72	50,36	3,52	0,08
ZBM1007	753,53	361,27	*	602,01	186,16	**	222,41	103,32	3,71	0,30
LEV0601	819,93	213,23	**	608,62	205,53	**	155,35	62,88	3,61	0,00
LEV0603	937,45	195,58	***	683,67	200,01	***	157,56	48,61	3,27	0,20
LEV0607	772,72	178,94	*	513,98	152,17	--	106,16	32,74	4,05	0,60
LBM1212	1.134,28	320,69	***	669,08	152,72	***	205,53	54,50	2,78	0,14
LEV0615	801,39	215,98	*	494,53	137,49	--	126,91	42,37	3,99	0,37
LEV0605	827,64	178,80	**	521,33	148,88	--	117,07	38,25	3,97	0,09
LEV0614	920,35	251,80	***	565,82	164,71	*	166,39	54,36	3,74	0,66
LBM1209	1.133,23	452,64	***	599,41	238,15	**	198,68	90,22	3,04	0,11
LCS0401	1.076,94	296,50	***	552,96	162,03	*	165,33	56,65	3,20	0,37
LEV0602	883,45	226,09	***	581,45	185,18	**	156,91	75,39	3,95	0,05
LBM1123	1.033,78	438,03	***	543,30	201,52	*	137,95	74,19	3,41	0,05
LPZ0913	885,75	173,42	***	670,63	161,68	***	215,47	33,74	3,98	0,06
LCS0303	1.061,31	194,31	***	576,16	130,59	**	218,05	71,46	3,38	0,03
LCS0407	1.203,25	443,21	***	765,93	316,79	***	190,79	74,35	3,01	0,33
LPB0201	1.025,96	268,60	***	520,45	114,48	--	183,65	54,06	3,59	0,19
LPB0212	1.002,73	260,67	***	551,27	128,99	*	189,42	64,31	3,69	0,13
LCS0411	1.000,27	271,33	***	621,79	267,09	***	183,07	62,37	3,71	0,04
LCS0308	1.079,07	275,36	***	543,30	201,12	*	171,71	63,99	3,41	0,56
ZBM1008	1.078,87	291,07	***	629,86	173,68	***	144,69	45,69	3,45	0,21
LCS0403	1.125,67	554,26	***	622,61	322,02	***	176,25	123,05	3,38	0,51
LEV0613	936,37	182,22	***	506,43	130,39	--	150,53	40,12	4,05	0,23
LBM0205	1.131,27	247,62	***	600,79	149,75	**	211,70	49,90	3,39	0,35
LCS0404	1.159,09	278,03	***	660,64	202,74	***	165,06	53,71	3,33	0,32
LBM1101	1.059,39	253,35	***	515,60	117,59	--	157,02	49,80	3,70	0,29
LBM1210	1.098,23	271,71	***	556,20	147,61	*	161,37	59,63	3,60	0,14
LPB0114	1.147,48	213,45	***	572,97	143,14	**	191,08	54,53	3,59	0,41
LCS0313	1.241,87	388,80	***	615,71	254,90	***	203,31	76,47	3,35	0,28
LCS0306	1.384,91	541,13	***	687,01	334,22	***	176,56	79,49	3,35	0,33

*** $p < 0,001$; ** para p entre 0,001 y 0,01; * para p entre 0,01 y 0,05 (prueba DMS)

Los aislados bacterianos con mayor eficiencia de fijación de N fueron LCS0306, LPB0114 y LCS0313, sin diferencias significativas entre ellos (prueba de la DMS, tabla 37).

Los controles sin inocular presentaron el mismo contenido de N y presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) con todos los aislados excepto con LET1901. Los aislados LPA1405 y LPA1413 presentaron muy baja eficiencia en la fijación de N_2 , pues las diferencias del contenido de N frente a los controles sin inocular fueron muy débiles desde el punto de vista estadístico ($0,01 < p < 0,05$, tabla 38).

La respuesta de las demás variables dependientes analizadas presentó la tendencia de valores máximos de biomasa aérea, masa de nódulos, P y K para LCS0306, significativamente superiores a los controles sin inocular ($p < 0,001$). El aislado con el contenido máximo de Ca, Mg y biomasa subterránea fue LCS0407.

El contenido de N mínimo en la biomasa aérea lo presentó un control sin inocular, que también presentó valores mínimos de P, biomasa subterránea y porcentaje de N. El valor mínimo de biomasa aérea fue el del aislado LPA1405, sin ser significativamente diferente de ninguno de los controles.

La masa de nódulos más baja la produjo LET1901, que también produjo el mínimo contenido de K y Ca en la biomasa aérea. El valor mínimo de Mg en la parte aérea correspondió a LPZ0913.

La tabla 39 muestra el valor de N total de cada uno de los aislados así como la eficiencia de fijación de N_2 de cada aislado (según Beck *et al.*, 1993) y el N obtenido por la fijación atmosférica (%Ndfa), obtenidos a partir de los promedios de N total en la biomasa aérea de los controles con N ($76,37 \text{ mg planta}^{-1}$, con una biomasa aérea de $1,99 \text{ g planta}^{-1}$).

La eficiencia de fijación de N_2 de los aislados en las condiciones hidropónicas estériles en las que se desarrolló el experimento varió entre el 5% (LET1901) y el 56% (LCS0306). Únicamente superó el valor del 50% el aislado LCS0306, mientras que el LCS0313 y el LPB0114 quedaron muy próximos al 50%. El nitrógeno obtenido mediante la fijación simbiótica osciló entre el 82% y el 28% del nitrógeno total contenido en la biomasa aérea.

Tomando como criterio el contenido de N en la biomasa aérea, los aislados bacterianos que presentaron una mayor eficiencia de fijación de N_2 fueron seleccionados para confirmar su eficiencia en una segunda fase en condiciones de cultivo idénticas a las de la primera. Estos aislados fueron LEV0613, ZBM1008, LCS0306, LEV0602, LCS0407, LPZ0913, LCS0308, LBM1123, LPB0201, LBM1101, LCS0403, LCS0303, LCS0411, LPB0205, LPB0114, LCS0404, LCS0313 y LBM1210.

Tabla 39. Valor medio del N en la biomasa aérea de cada aislado y su eficiencia de fijación de N₂ respecto al control con N

Tratamiento	N total (mg planta ⁻¹)	Eficiencia fijación N ₂ (%)	%Ndfa	Tratamiento	N total (mg planta ⁻¹)	Eficiencia fijación N (%)	%Ndfa
LCS0306	46,43	56	82	LEV0601	29,57	31	73
LCS0313	41,62	49	80	ZBM1007	28,32	30	71
LPB0114	41,60	49	80	LPP0708	28,25	29	71
LBM1210	39,66	46	80	LEV0609	28,01	29	71
LBM1101	38,94	45	79	LET1912	27,80	29	71
LCS0404	38,52	45	79	LPA1417	27,25	28	70
LPB0205	38,26	44	79	LPA1414	26,85	27	70
LEV0613	37,86	44	79	LPB0111	26,83	27	70
LCS0403	37,57	43	78	LPZ0914	26,81	27	70
ZBM1008	37,40	43	78	LCS0408	26,58	27	69
LCS0308	37,26	43	78	LPP0704	26,44	27	69
LCS0411	37,17	43	78	LPP0703	25,80	26	69
LPB0212	36,92	42	78	LBM1113	24,17	24	66
LPB0201	36,65	42	78	LCS0305	23,36	22	65
LCS0407	36,10	41	77	LEV0612	23,29	22	65
LCS0303	35,83	41	77	LPA1410	19,43	17	58
LPZ0913	35,25	40	77	LPA1403	19,35	16	58
LBM1123	35,18	40	77	ZBM1005	18,77	16	57
LEV0602	34,87	39	77	LPA1413	15,21	10	47
LCS0401	34,70	39	77	LPA1405	14,06	9	42
LBM1209	34,43	39	76	LET1901	11,32	5	28
LEV0614	34,02	38	76	NNgh	9,51	--	--
LEV0605	32,86	36	75	NNd	8,64	--	--
LEV0615	31,72	35	74	NNc	8,12	--	--
LBM1212	31,35	34	74	Nnef	7,69	--	--
LEV0607	31,05	34	74	NNb	7,53	--	--
LEV0603	30,60	33	73	Nna	7,27	--	--

4.4.2. Estudio de la eficiencia de fijación de N₂ de 18 aislados bacterianos preseleccionados

En esta segunda fase del análisis en cultivo hidropónico las variables dependientes fueron la biomasa aérea, la biomasa subterránea, la masa de nódulos, el porcentaje de N en la biomasa aérea y su contenido de N.

La tabla 40 muestra los resultados del ANOVA y la tabla 41 los valores medios de las variables dependientes para cada aislado. La comparación de medias mediante la prueba DMS se realizó para el contenido de N en la biomasa aérea tomando como referencia el aislado de mayor eficiencia de fijación de N₂. El orden en la tabla corresponde con niveles descendentes de N total.

Tabla 40. ANOVA de las variables dependientes analizadas en el experimento de cámara de crecimiento con 18 aislados de elevada eficiencia de fijación de N₂

Variable	Suma cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p
Biomasa aérea	211,77	20	10,59	97,27	0,000
Biomasa subterránea	61,33	20	3,07	101,76	0,000
Masa de nódulos	5,10	18	0,28	97,56	0,000
N (%) en biomasa aérea	2287,35	20	114,37	3236,62	0,000
N total en biomasa aérea	286239,66	20	14311,98	90,13	0,000

Tabla 41. Valores medios de las variables dependientes analizadas en la segunda fase del experimento de eficiencia en la fijación de N₂ y comparación de medias respecto al aislado LEV0613 para el contenido de N en la biomasa aérea (prueba DMS)

Tratamiento de inoculación	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)	Biomasa subterránea (g planta ⁻¹)	Masa de nódulos (g planta ⁻¹)	N%	N total (mg planta ⁻¹)	Sig.	Eficiencia fijación N (%)	%Ndfa
NQ ₁₈	2,12	1,02	0,00	4,38	92,57	***	100	87
LEV0613	1,22	0,63	0,21	3,70	45,40		42	74
ZBM1008	1,04	0,55	0,18	3,85	40,07		35	70
LCS0306	1,10	0,62	0,20	3,43	37,77		32	69
LEV0602	1,02	0,55	0,19	3,43	35,16		29	66
LCS0407	0,99	0,48	0,16	3,52	34,96		29	66
LPZ0913	0,95	0,54	0,20	3,66	34,32		28	65
LCS0308	1,03	0,48	0,18	3,04	31,42		24	62
LBM1123	0,89	0,49	0,15	3,54	31,31	*	24	62
LPB0201	0,88	0,52	0,17	3,54	31,00	*	24	62
LBM1101	0,87	0,47	0,14	3,50	30,40	*	23	61
LCS0403	0,87	0,47	0,16	3,45	30,00	*	22	60
LCS0303	1,01	0,57	0,20	2,93	29,65	*	22	60
LCS0411	0,91	0,56	0,18	3,17	28,92	**	21	59
LPB0205	0,93	0,55	0,19	3,04	28,32	**	20	58
LPB0114	0,74	0,40	0,14	3,43	25,55	**	17	54
LCS0404	0,78	0,38	0,11	3,26	25,41	**	17	53
LCS0313	0,74	0,50	0,14	3,06	22,53	***	13	47
LBM1210	0,75	0,52	0,15	2,76	20,71	***	11	43
NN ₁₈	0,67	0,41	0,00	1,76	11,85	***	0	0

*** $p < 0,001$; ** para p entre 0,001 y 0,01; * para p entre 0,01 y 0,05 (prueba DMS)

En todas las variables analizadas aparecieron diferencias significativas. El control con N presentó un contenido de N en la biomasa del doble del más eficiente de los aislados (LEV0613), significativamente más elevado que este aislado. Para la misma variable, no hubo diferencias significativas entre los aislados LEV0613, ZBM1008, LCS0306, LEV0602, LCS0407, LPZ0913 y LCS0308. Sus eficiencias de fijación de N₂ oscilaron entre el 24% y el 42%, y el N derivado de la fijación atmosférica estuvo entre el 62% y el 74%.

4.4.3. Discusión del experimento en cultivo hidropónico

Todos los aislados fueron capaces de producir nódulos en alubia con excepción de las cepas LPA0715, LPB0108, LPA1401 y LET1913. Esto se observó por la presencia o ausencia de nódulos. Los aislados mostraron un rango amplio de eficiencia de fijación de N₂, desde la ausencia total en LET1901 (*Rhizobium giardinii*) hasta una eficiencia del 56% del aislado LCS0306 (*R. leguminosarum*), con un 82% del N de su biomasa aérea derivado de la fijación simbiótica. Excepto LPA1405 y LPA1413 (*R. leguminosarum*), que sólo presentaron baja diferencia significativa con el control sin N, los restantes aislados mostraron diferencias altamente significativas frente a dicho control. *R. giardinii* es característico por la ineficiencia de fijación de N₂ ya que carece del conjunto de genes *nif* (Amarger *et al.*, 1997; Ibáñez *et al.*, 2008), lo que justifica la ineficiencia de LET1901. Sin embargo, el otro aislado identificado como *R. giardinii* (LET1912) presentó una diferencia altamente significativa en el contenido de N en la biomasa aérea con los controles sin N, con un 29% de eficiencia de fijación y un 71% de N derivado de la fijación simbiótica. Esto

concuenda con Mostasso *et al.* (2002), quienes sugirieron que *R. giardinii* podría ser una especie fijadora de N₂ ya que también encontraron este aislado en nódulos efectivos en las plantas de alubia en Brasil.

Rodríguez-Navarro *et al.* (2000) observaron también un desarrollo de la biomasa aérea inferior en plantas de alubia inoculadas con aislados de *R. etli* de Andalucía (España) en comparación con un control con N, lo mismo observaron Giongo *et al* (2007) y Hungria *et al.* (2000) en alubia en Brasil inoculada con *R. tropici*. No obstante, Hungria *et al.* (2003) y Mostasso *et al.* (2002) consiguieron una cantidad de N en la biomasa aérea superior con algunos aislados en comparación con el control con N, aunque hay que tener en cuenta que la cantidad de N aportada al control por estos autores fue muy inferior a la del presente estudio. No existen muchos estudios que comparen la eficiencia de fijación de N₂ entre especies con capacidad de nodular alubia, sin embargo Rodríguez-Navarro *et al.* (2000) incluyeron *R. leguminosarum* en su estudio en condiciones de cultivo hidropónico y observaron una nodulación abundante, una biomasa aérea intermedia entre los controles con N y sin N y unos valores de eficiencia de fijación de N₂ que oscilan entre el 14% y el 83%. Estos aislados provenían de zonas sin tradición en el cultivo de la alubia. Varios estudios coinciden en que la alubia presenta una eficiencia de fijación de N₂ media o baja, en contraste con la soja, que en algunos casos presenta eficiencias de fijación que superan los rendimientos del control con N.

Los aislados de mayor eficiencia en el cultivo hidropónico se sometieron al experimento de microcosmos, y fueron LEV0613, LCS0306, LPZ0913, ZBM1008 y LBM1123. Los aislados LCS0308, LCS0407 y LEV0602 presentaron una eficiencia superior (sin diferencias significativas) con LEV0613, pero se incluyó LBM1123 para tener una representación más amplia de aislados de zonas de la IGP en el experimento de microcosmos, ya los excluidos pertenecen a la Cepeda y el Valle del Esla, que ya están representados por LCS0306 y LEV0613 respectivamente.

4.5. Selección de los aislados de elevada eficiencia de fijación de N₂ en condiciones de microcosmos

4.5.1. Número Más Probable de los sustratos

El Número Más Probable (NMP) sirvió para evaluar la presencia de rizobios con capacidad para nodular alubia en los suelos empleados en los experimentos de microcosmos y de campo. Las plantas fueron inoculadas con 1 mL de las diluciones decimales seriadas del suelo de Sueros y de ESTIA desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶. La nodulación observada se presenta en la tabla 42.

Tabla 42. Presencia (+) y ausencia (-) de nodulación del experimento del Número Más Probable (NMP)

Dilución	Sueros				ESTIA			
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	-	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻³	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁴	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁶	-	-	+	-	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-
Total				17				3

El número de rizobios que nodulan alubia por gramo de suelo en Sueros fue de $3,1 \cdot 10^4$ rizobios y en la ESTIA fue de 10 rizobios. Con este resultado, se asume que los dos suelos contenían diferente concentración de rizobios de alubia. Teniendo en cuenta que en Sueros no se había cultivado alubia previamente, y que el año previo al muestreo se cultivó patata, el número de rizobios infectivos de alubia fue elevado. De todas formas, como observó Hirsh (1996), las poblaciones en suelos favorables para el mantenimiento como bacterias saprofitas del suelo, se pueden mantener durante años en valores superiores a 10^4 rizobios por gramo de suelo del grupo de *Rhizobium leguminosarum*.

4.5.2. Análisis de los resultados

Con el experimento de microcosmos se llevó a cabo la selección de cepas inoculadas en plantas de alubia cultivadas en condiciones de microcosmos sobre los suelos de Sueros de Cepeda y de la ESTIA (León). Los cinco aislados de rizobios con mejores resultados en medio hidropónico estéril fueron empleados como inoculantes en estos sustratos. Los datos recogidos de las plantas fueron la biomasa aérea, el rendimiento (producción de semillas por planta) y los componentes del rendimiento: número de semillas y de vainas por planta, número de semillas por vaina, peso de 1000 semillas, el contenido de N total en las semillas y el índice de cosecha (IC).

4.5.2.1. ANOVA de los factores año, suelo y tratamiento de inoculación

La tabla 43 muestra el resultado del ANOVA combinado del experimento de microcosmos para todas las variables dependientes y las variables independientes año, suelo y tratamiento de inoculación. La tabla 44 muestra el resultado del ANOVA del experimento de microcosmos para cada año considerando como variables independientes el suelo y el tratamiento de inoculación. La tabla 45 presenta los valores medios de las variables dependientes y su comparación mediante la prueba *post hoc* de la diferencia mínima significativa (DMS, $p < 0,05$).

Tabla 43. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en microcosmos considerando como variables independientes el año, el suelo y el tratamiento de inoculación

	Biomasa aérea (g)			Índice de Cosecha			Vainas por Planta			Semillas por Vaina		
	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p
Año	252644,172	4186,427	0,000	47,351	9255,675	0,000	22283,301	2708,310	0,000	333,646	8603,570	0,000
Suelo	372685,564	4552,451	0,000	69,822	7545,629	0,000	33508,931	4228,520	0,000	4893,783	6582,113	0,000
Inoculación	105987,416	1196,502	0,000	19,994	2274,812	0,000	9524,652	1108,449	0,000	1398,607	1876,576	0,000
Año*Suelo	128,524	2,876	0,057	0,158	35,271	0,000	3,767	0,498	0,608	1,356	3,561	0,029
Año*Inoculación	122,279	2,454	0,004	0,011	2,487	0,004	9,761	1,193	0,284	0,483	1,267	0,234
Suelo*Inoculación	125,026	1,711	0,116	0,010	1,094	0,365	5,332	0,670	0,674	0,854	1,151	0,331
Año*Suelo*Inoculación	93,843	2,901	0,001	0,006	1,709	0,061	15,192	2,056	0,018	0,358	0,964	0,482

Tabla 43. CONTINUACIÓN

	Peso 1000 Semillas (g)			Peso Semillas (g planta ⁻¹)			N en Semillas (mg planta ⁻¹)		
	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p
Año	1312,256	3,219 10 ⁵	0,000	298,908	2,512 10 ⁴	0,000	1449,329	9,010 10 ⁴	0,000
Suelo	1967,786	3,211 10 ⁵	0,000	448,569	4,019 10 ⁴	0,000	2174,047	1,370 10 ⁵	0,000
Inoculación	562,217	8,961 10 ⁴	0,000	128,057	1,021 10 ⁴	0,000	620,973	3,404 10 ⁴	0,000
Año*Suelo	0,056	14,843	0,000	0,100	9,846	0,000	0,067	5,278	0,005
Año*Inoculación	0,002	0,586	0,854	0,016	1,407	0,158	0,030	1,992	0,023
Suelo*Inoculación	0,003	0,516	0,797	0,009	0,792	0,576	0,025	1,648	0,132
Año*Suelo*Inoculación	0,007	1,800	0,045	0,016	1,599	0,088	0,030	2,661	0,002

Tabla 44. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en microcosmos considerando como variables independientes el suelo y el tratamiento de inoculación para cada uno de los años 2007, 2008 y 2009

	Biomasa aérea (g)			Índice de Cosecha			Vainas por Planta			Semillas por Vaina		
	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p
Año 2007												
Suelo	177994,777	4281,824	0,000	20,615	3309,254	0,000	12926,704	2054,428	0,000	2363,856	5236,799	0,000
Inoculación	50886,893	1225,737	0,000	5,942	1301,427	0,000	3670,388	505,724	0,000	675,603	1484,377	0,000
Suelo*Inoculación	19,149	0,664	0,679	0,011	2,604	0,019	7,393	1,169	0,325	0,797	1,827	0,096
Año 2008												
Suelo	127539,757	1799,219	0,000	16,528	4146,660	0,000	10797,439	1079,037	0,000	940,951	2379,231	0,000
Inoculación	36360,041	475,978	0,000	4,693	877,966	0,000	3080,999	294,103	0,000	268,857	660,913	0,000
Suelo*Inoculación	252,703	5,548	0,000	0,007	2,068	0,060	22,846	2,422	0,029	0,584	1,498	0,182
Año 2009												
Suelo	78041,546	3042,944	0,000	34,071	10767,678	0,000	9904,534	1460,450	0,000	1695,128	5711,279	0,000
Inoculación	22028,210	614,124	0,000	9,730	2862,516	0,000	2823,514	393,263	0,000	484,871	1702,174	0,000
Suelo*Inoculación	15,415	0,621	0,714	0,002	0,604	0,727	5,008	0,741	0,617	0,103	0,354	0,907

Tabla 44. CONTINUACIÓN

	Peso 1000 Semillas (g)			Peso Semillas (g planta ⁻¹)			N en Semillas (mg planta ⁻¹)		
	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p	Med Cuadr	F	p
Año 2007									
Suelo	6651,662	2409020,820	0,000	168,052	16145,473	0,000	800,133	75367,382	0,000
Inoculación	190,184	72738,101	0,000	48,003	4327,118	0,000	228,573	18792,770	0,000
Suelo*Inoculación	0,007	2,959	0,009	0,007	0,634	0,703	0,008	0,742	0,616
Año 2008									
Suelo	611,500	214927,624	0,000	129,729	10647,086	0,000	653,015	35034,832	0,000
Inoculación	174,715	60177,065	0,000	37,078	3078,779	0,000	186,614	10623,202	0,000
Suelo*Inoculación	0,002	0,506	0,804	0,027	2,395	0,030	0,060	4,325	0,000
Año 2009									
Suelo	691,364	125551,224	0,000	151,111	18681,598	0,000	721,836	73079,792	0,000
Inoculación	197,507	30144,861	0,000	43,068	3566,243	0,000	206,085	13228,607	0,000
Suelo*Inoculación	0,006	1,163	0,328	0,005	0,652	0,689	0,013	1,371	0,228

Tabla 45. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en microcosmos durante 2007, 2008 y 2009 para las variables independientes año, suelo y tratamiento de inoculación (prueba DMS, $p < 0,05$, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente)

	Biomasa aérea (g)		Índice de Cosecha		Vainas por Planta		Semillas por Vaina		Peso 1000 Semillas (g)		Peso Semillas (g planta⁻¹)		N en Semillas (mg planta⁻¹)	
	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS
Año														
Año 2007	41,41	c	0,45	a	11,16	b	4,79	c	350,94	a	18,45	b	631,38	c
Año 2008	38,08	b	0,44	a	11,14	b	3,30	a	459,35	c	16,31	a	590,07	b
Año 2009	27,46	a	0,58	b	9,83	a	4,08	b	407,77	b	15,93	a	474,06	a
Suelo ¹														
ESTIA	39,46		0,48		11,52		4,03		414,23		18,43		630,88	
Sueros	31,61		0,50		9,86		4,16		391,72		15,44		497,04	
Inoculación														
LCS0306	34,44	ab	0,51	b	10,80	ab	4,10	a	403,69	a	17,28	b	585,14	b
LEV0613	34,77	ab	0,50	b	10,54	ab	4,18	a	404,96	a	17,03	b	556,12	b
LPZ0913	32,41	a	0,49	b	10,11	a	4,18	a	391,49	a	15,67	a	503,40	a
ZBM1008	34,05	ab	0,50	b	10,69	ab	3,92	a	409,45	a	16,69	ab	548,10	ab
LBM1123	35,37	b	0,50	b	10,66	ab	4,16	a	412,90	a	17,45	b	545,55	b
Control sin Nitrógeno	34,92	ab	0,49	b	10,76	ab	4,01	a	404,96	a	16,75	ab	544,74	ab
Control con Nitrógeno	42,79	c	0,43	a	11,24	b	4,14	a	392,96	a	17,63	b	663,68	c

1: Para la variable independiente Suelo, los valores promedio de todas las variables dependientes fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$)

En el resultado del ANOVA combinado para el ensayo de microcosmos considerando como variables independientes los años en los que éste se estableció, los suelos y el tratamiento de inoculación (tabla 43) se observó que todas las variables dependientes presentaron diferencias significativas para las tres variables independientes.

Las interacciones entre el año y el suelo fueron significativas para el índice de cosecha, el número de semillas por vaina, el peso de 1000 semillas, el rendimiento por planta y el N acumulado en semillas. La interacción entre el año y el tratamiento de inoculación se produjo para la biomasa aérea, el índice de cosecha y el N acumulado en semillas. No hubo interacciones entre el suelo y la inoculación, y la interacción triple año-suelo-inoculación se observó en todas las variables excepto el número de semillas por vaina y el peso de semillas.

En lo relativo al ANOVA por años para las variables independientes suelo y tratamiento de inoculación (tabla 44) existieron diferencias significativas para todas las variables dependientes.

La biomasa aérea (tabla 45) fue diferente los tres años, siendo superior en 2007 e inferior en 2009. En el suelo ESTIA fue superior a Sueros. El control con N fue el que produjo mayor biomasa aérea. El aislado LBM1123 produjo más biomasa aérea que LPZ0913.

El IC del año 2009 fue superior a los dos años previos. Entre inóculos no existieron diferencias significativas, pero todos produjeron valores de IC superiores al del control con N.

El número de vainas por planta fue inferior en 2009 frente a los años anteriores. El inóculo LPZ0913 presentó un número de vainas por planta inferior al control con N.

El número de semillas por vaina fue diferente los tres años, siendo más elevado en 2007 y más reducido en 2008. El tamaño medio de las semillas también fue diferente entre años, con tendencia opuesta al número de semillas por vaina. Para ninguna de estas dos variables hubo diferencias entre inóculos.

El rendimiento de semillas por planta fue superior en el año 2007 frente a los dos siguientes. La inoculación con LCS0306, LBM1123, ZBM1008 y LEV0613 produjo el mismo rendimiento que el control con N. Sin embargo, el rendimiento cuando se inoculó con LPZ0913 fue inferior a dicho control.

El N acumulado en las semillas fue máximo en 2007 y mínimo en 2009, con diferencias entre los tres años. El control con N presentó un valor de N en semillas superior al de los tratamientos inoculados. Entre ellos, las plantas inoculadas con LCS0306, LEV0613 y LBM1123 presentaron más N que las inoculadas con LPZ0913.

4.5.2.2. Análisis de las interacciones entre variables independientes

La tabla 46 muestra la comparación de los valores medios de las variables dependientes para las variables independientes año y tratamiento de inoculación en cada uno de los suelos por separado y la tabla 47 presenta esta información para la variable independiente tratamiento de inoculación en cada año y cada suelo por separado.

4.5.2.2.1. Análisis de las interacciones entre año y suelo

Existen interacciones entre año y suelo en las variables IC, semillas por vaina, peso de 1000 semillas, peso de semillas y N en semillas (tabla 43).

Los valores de IC en ambos suelos fueron parecidos en 2007 y 2009 mientras que en 2008 se vio perjudicado el IC en el suelo ESTIA, siendo significativamente inferior al de Sueros (figura 36, tabla 46)

El número de semillas por vaina en 2009 en ESTIA fue ligeramente superior al de Sueros, lo contrario que en los años previos (figura 37), con lo que el número de vainas se vio ligeramente favorecido en 2009 en el suelo ESTIA.

En el tamaño medio de las semillas hubo una gran diferencia entre suelos en 2009 frente a los años previos, donde los valores eran casi idénticos entre ambos suelos (figura 38). Las semillas fueron mayores en ESTIA que en Sueros en 2009. Este hecho, junto con el mayor número de semillas por vaina y de vainas por planta en ESTIA en 2009 tuvo como consecuencia que el rendimiento en semillas se viera beneficiado en ese suelo y en ese año. Esta interacción a nivel del peso de las semillas (figura 39) contrasta con la acumulación de N en las semillas (figura 40), ya que en ambos suelos en 2009 se produce el menor contenido de los tres años del experimento. De este resultado se deduce que la proporción del N en las semillas de la ESTIA en 2009 fue menor que en las de Sueros, lo que se ve reflejado en valor del porcentaje de N en semillas (datos no mostrados).

De forma global, estas interacciones muestran que en 2008 el IC y el rendimiento se vieron perjudicados en el suelo de ESTIA respecto al suelo de Sueros.

Tabla 46. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en microcosmos para las variables independientes año y tratamiento de inoculación, en cada suelo (prueba DMS, $p < 0,05$, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente)

Variable	Biomasa aérea (g)	Índice de Cosecha	Vainas por Planta	Semillas por Vaina	Peso 1000 Semillas (g)	Peso Semillas (g planta ⁻¹)	N en Semillas (mg planta ⁻¹)
Suelo ESTIA							
Año							
Año 2007	45,06 c	0,44 b	12,14 b	4,67 c	353,88 a	19,89 c	696,66 c
Año 2008	42,98 b	0,39 a	11,93 b	3,19 a	459,58 c	16,84 a	644,00 b
Año 2009	30,81 a	0,59 c	10,54 a	4,11 b	436,50 b	18,27 b	553,25 a
Inoculación							
LCS0306	39,40 a	0,50 a	11,83 a	4,13 a	413,30 a	19,34 a	693,74 b
LEV0613	38,90 a	0,48 a	11,33 a	4,05 a	410,28 a	18,14 a	621,70 b
LPZ0913	36,14 a	0,48 a	10,62 a	4,13 a	418,81 a	17,15 a	552,98 a
ZBM1008	38,54 a	0,48 a	11,37 a	3,99 a	416,26 a	18,37 a	615,40 ab
LBM1123	39,09 a	0,50 a	11,88 a	3,94 a	426,41 a	18,91 a	601,82 b
Control sin Nitrógeno	39,25 a	0,48 a	11,56 a	3,98 a	412,66 a	18,23 a	616,51 ab
Control con Nitrógeno	44,24 b	0,44 a	11,84 a	4,06 a	403,06 a	18,64 a	699,03 c
Suelo SUEROS							
Año							
Año 2007	37,77 c	0,45 a	10,18 b	4,90 c	348,00 a	17,02 c	566,10 b
Año 2008	33,13 b	0,48 b	10,35 b	3,41 a	459,12 c	15,53 b	535,50 b
Año 2009	24,11 a	0,56 c	9,12 a	4,04 b	379,04 b	13,59 a	394,87 a
Inoculación							
LCS0306	29,48 a	0,52 b	9,76 a	4,07 ab	394,08 a	15,23 a	476,54 a
LEV0613	30,65 a	0,52 b	9,74 a	4,30 b	399,63 a	15,93 a	490,53 a
LPZ0913	29,65 a	0,50 b	9,74 a	4,21 ab	371,29 a	14,57 a	466,75 a
ZBM1008	28,34 a	0,52 b	9,84 a	3,84 a	400,86 a	14,58 a	463,10 a
LBM1123	31,65 a	0,51 b	9,44 a	4,39 b	399,39 a	16,00 a	489,29 a
Control sin Nitrógeno	30,59 a	0,51 b	9,93 a	4,04 ab	397,25 a	15,28 a	472,97 a
Control con Nitrógeno	41,23 b	0,42 a	10,60 a	4,24 ab	382,10 a	16,56 a	625,69 b

Tabla 47. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en microcosmos para la variable independiente tratamiento de inoculación, en cada año y en cada suelo (prueba DMS, $p < 0,05$, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente)

	Biomasa aérea (g)			IC			Vainas por Planta			Semillas por Vaina			
	ESTIA	Sueros	Promedio	ESTIA	Sueros	Promedio	ESTIA	Sueros	Promedio	ESTIA	Sueros	Promedio	
Año 2007	LCS0306	43,63 a	37,78 ab	40,809 b	0,47 c	0,48 b	0,47 b	12,60	11,29	11,97	4,71	4,63 a	4,67 ab
	LEV0613	45,08 a	35,15 ab	40,114 ab	0,44 bc	0,49 b	0,47 b	12,67	9,07	10,87	4,65	5,16 ab	4,91 b
	LPZ0913	41,69 a	35,09 ab	37,210 a	0,43 bc	0,48 b	0,46 b	11,56	10,37	10,75	4,86	4,89 ab	4,88 ab
	ZBM1008	43,09 a	34,20 a	40,123 ab	0,46 bc	0,47 b	0,46 b	12,10	10,40	11,53	4,55	4,56 a	4,55 a
	LBM1123	44,74 a	38,10 b	41,420 b	0,48 c	0,47 b	0,48 b	12,53	9,87	11,20	4,58	5,28 b	4,93 b
	Control sin N	43,51 a	36,20 ab	39,733 ab	0,41 ab	0,47 b	0,45 b	11,36	10,73	11,03	4,76	4,59 a	4,67 ab
	Control con N	52,85 b	47,37 c	50,107 c	0,37 a	0,32 a	0,35 a	11,87	9,67	10,77	4,75	5,08 ab	4,91 b
	Promedio ¹	44,94	37,70		0,44	0,45		12,10	10,20		4,69	4,88	
Año 2008	LCS0306	44,47 bcd	28,35 a	36,09 ab	0,41 b	0,51 c	0,46 b	12,33	9,00 a	10,60 a	3,34	3,58	3,46
	LEV0613	41,71 abc	31,56 a	36,84 ab	0,39 b	0,50 bc	0,44 b	10,77	10,42 a	10,60 a	3,40	3,43	3,42
	LPZ0913	39,11 a	29,08 a	33,89 a	0,42 b	0,45 ab	0,44 b	11,75	10,08 a	10,88 ab	3,25	3,05	3,15
	ZBM1008	40,34 ab	29,13 a	34,74 a	0,39 b	0,49 bc	0,44 b	11,23	10,23 a	10,73 ab	3,14	3,18	3,16
	LBM1123	43,08 bcd	31,03 a	36,79 ab	0,38 a	0,51 c	0,45 b	12,27	9,58 a	10,87 ab	2,93	3,67	3,32
	Control sin N	45,49 cd	34,34 a	40,13 b	0,41 b	0,47 bc	0,44 b	13,62	10,00 a	11,88 ab	3,09	3,56	3,32
	Control con N	46,49 d	50,97 b	48,54 c	0,35 a	0,41 a	0,37 a	11,62	13,55 b	12,50 b	3,14	3,40	3,26
	Promedio	42,96	33,49		0,39	0,48		11,94	10,41		3,18	3,41	
Año 2009	LCS0306	31,10	22,72	26,91 a	0,61	0,56	0,58	10,67	9,00	9,83 ab	4,18	3,97	4,08 a
	LEV0613	29,67	25,42	27,47 ab	0,60	0,57	0,59	10,43	9,87	10,14 ab	4,01	4,14	4,08 a
	LPZ0913	29,55	22,79	26,05 a	0,58	0,56	0,57	8,92	8,57	8,74 a	4,44	4,37	4,41 b
	ZBM1008	31,00	23,75	27,38 ab	0,59	0,58	0,58	10,53	9,13	9,83 ab	3,97	3,93	3,95 a
	LBM1123	30,53	25,26	27,99 ab	0,59	0,56	0,58	10,93	8,86	9,93 ab	4,03	4,06	4,05 a
	Control sin N	29,88	21,99	25,93 a	0,59	0,58	0,58	10,07	9,07	9,57 ab	4,01	3,86	3,94 a
	Control con N	33,68	27,01	30,46 b	0,59	0,53	0,56	12,00	9,29	10,69 b	4,16	4,00	4,08 a
	Promedio	30,77	24,13		0,59	0,56		10,51	9,11		4,11	4,05	

1: Para la variable independiente Suelo, los valores promedio de todas las variables dependientes fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$)

Tabla 47. Continuación

		Peso de 1000 semillas (g)			Peso de semillas (g planta ⁻¹)			N en semillas (mg planta ⁻¹)		
		ESTIA	Sueros	Media	ESTIA	Sueros	Media	ESTIA	Sueros	Media
Año 2007	LCS0306	357,08 bcd	354,81 bc	355,99 b	20,73	18,18	19,50 ab	725,71	603,85	666,88 b
	LEV0613	344,23 abc	377,79 c	361,01 b	20,00	17,31	18,65 ab	702,53	537,46	620,00 ab
	LPZ0913	327,36 ab	338,89 ab	335,18 a	18,19	16,79	17,24 a	609,39	558,92	575,14 a
	ZBM1008	367,09 cd	344,60 ab	359,60 b	19,97	16,10	18,68 ab	678,19	535,89	630,76 ab
	LBM1123	379,52 d	351,11 bc	365,32 b	21,52	18,01	19,76 b	726,11	556,57	641,34 ab
	Control sin N	337,16 abc	354,85 bc	346,31 ab	18,30	17,23	17,75 ab	628,57	549,85	587,86 a
	Control con N	348,59 abc	315,72 a	332,15 a	19,69	15,36	17,53 a	772,83	614,55	693,69 b
	Promedio	351,58	348,25		19,77	17,00		691,90	565,30	
Año 2008	LCS0306	449,80	464,14	457,26	18,10	14,62 a	16,29 ab	802,60 d	459,71 a	624,30 b
	LEV0613	457,28	464,91	460,94	16,31	15,90 a	16,12 ab	596,42 bc	507,25 a	553,62 ab
	LPZ0913	460,89	442,84	451,50	16,52	13,21 a	14,80 a	552,38 a	447,41 a	497,80 a
	ZBM1008	451,98	458,39	455,18	15,74	14,39 a	15,06 a	584,89 ab	451,97 a	518,43 a
	LBM1123	497,41	456,87	476,26	16,60	15,76 a	16,16 ab	572,12 a	505,71 a	537,47 ab
	Control sin N	450,93	464,32	457,36	18,82	16,00 ab	17,47 b	695,22 bcd	520,98 a	611,59 b
	Control con N	453,93	463,77	458,44	16,11	21,10 b	18,40 b	698,49 cd	907,05 b	794,08 c
	Promedio	460,32	459,32		16,89	15,85		643,16	542,87	
Año 2009	LCS0306	440,32	370,01	405,17	18,94	13,02	15,98	574,70 ab	372,30	473,50 ab
	LEV0613	437,40	369,26	402,16	17,85	14,56	16,15	558,57 ab	430,22	492,18 ab
	LPZ0913	443,29	348,81	394,30	17,01	12,82	14,84	514,48 a	359,60	434,18 a
	ZBM1008	450,85	388,50	419,67	18,51	13,73	16,12	558,12 ab	424,21	491,17 ab
	LBM1123	421,24	401,84	411,87	17,99	14,05	16,09	499,31 a	403,11	452,87 ab
	Control sin N	449,95	386,01	417,98	17,64	12,75	15,19	537,04 a	357,69	447,37 a
	Control con N	413,44	389,05	401,66	19,77	14,27	17,11	625,69 b	416,56	524,73 b
	Promedio	436,64	379,07		18,24	13,60		552,56	394,81	

1: Para la variable independiente Suelo, los valores promedio de todas las variables dependientes fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$)

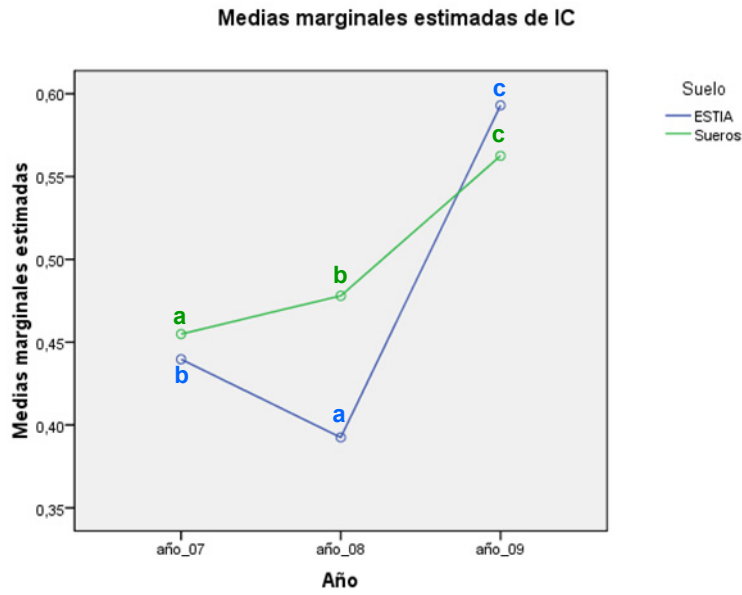


Figura 36. Valores medios del IC por año y suelo en el experimento de microcosmos.

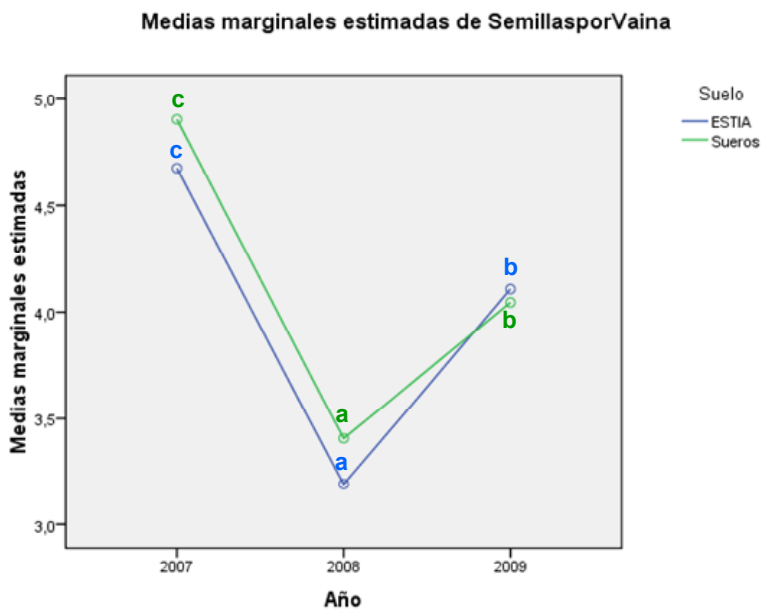


Figura 37. Valores medios del número de semillas por vaina por año y suelo en el experimento de microcosmos.

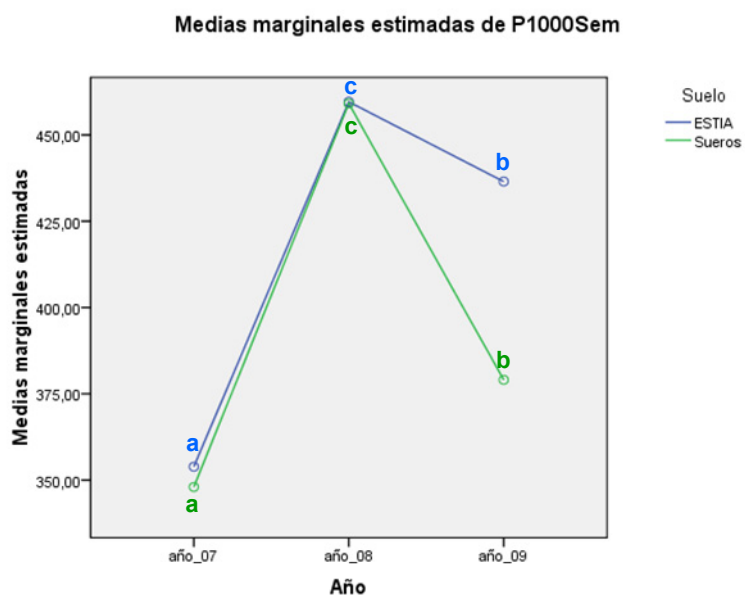


Figura 38. Valores medios del peso de 1000 semillas (g) por año y suelo en el experimento de microcosmos.

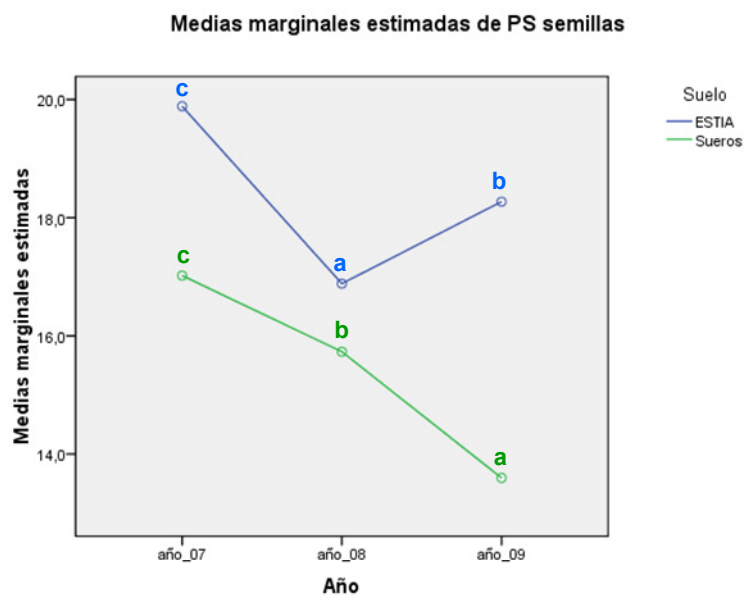


Figura 39. Valores medios del peso de semillas (g planta⁻¹) por año y suelo en el experimento de microcosmos.

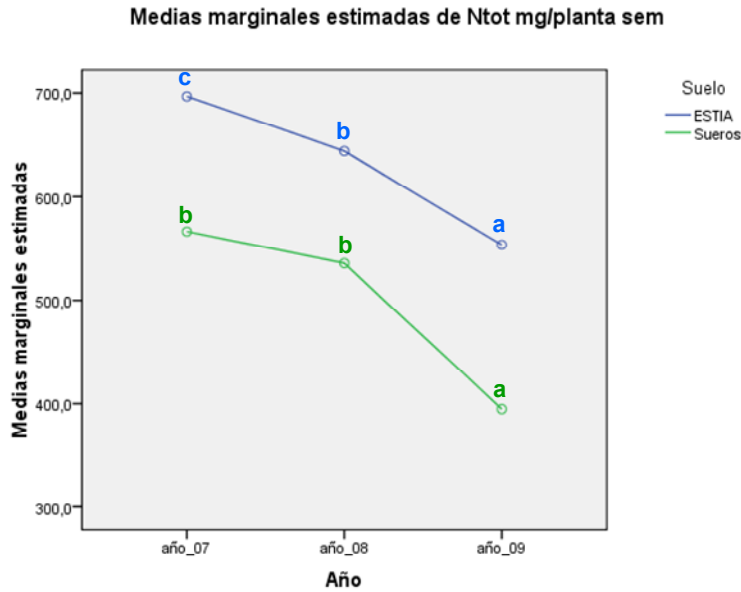


Figura 40. Valores medios del N acumulado en semillas (mg planta^{-1}) por año y suelo en el experimento de microcosmos.

4.5.2.2.2. Análisis de las interacciones entre año e inoculación

La interacción entre año e inoculación fue significativa para las variables dependientes biomasa aérea, IC y N en semillas (tabla 43).

En el año 2009 hubo una gran homogeneidad en los valores de biomasa entre los distintos tratamientos e inóculos, pero en 2007 y en 2008 el control con N tuvo una producción de biomasa más elevada que los demás tratamientos (figura 41). Ese desarrollo vegetativo no se vio correspondido con un incremento similar de la producción de semillas, lo que se reflejó en valores menores del IC esos años (figura 42). El mismo efecto se tradujo en una cantidad superior de N en las semillas en 2007 y en 2008 frente a 2009 (figura 43).

Otra interacción está en el hecho de que en 2008 la biomasa del control sin N sea superior a las plantas inoculadas con LPZ0913 y ZBM1008 (figura 41), lo que no aconteció los años 2007 y 2009. Esto se refleja en el N en semillas, que sigue una tendencia igual.

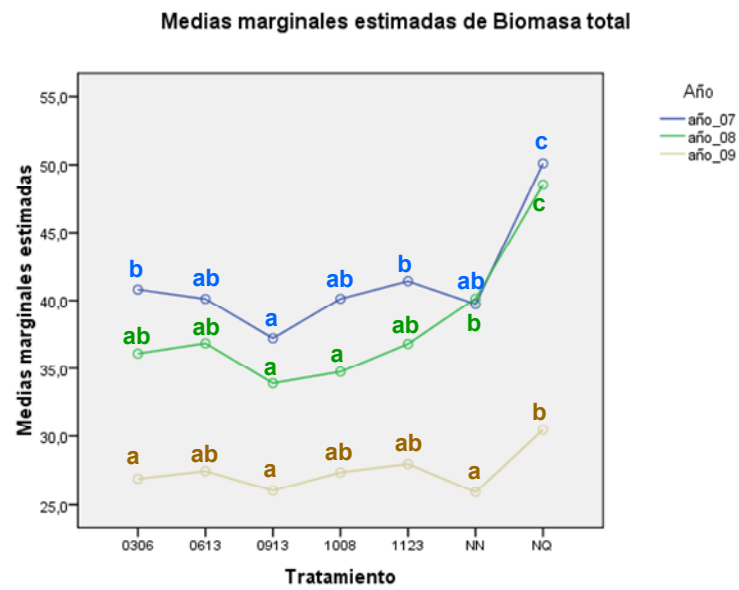


Figura 41. Valores medios de la biomasa aérea (g planta⁻¹) por tratamiento de inoculación y suelo en el microcosmos.

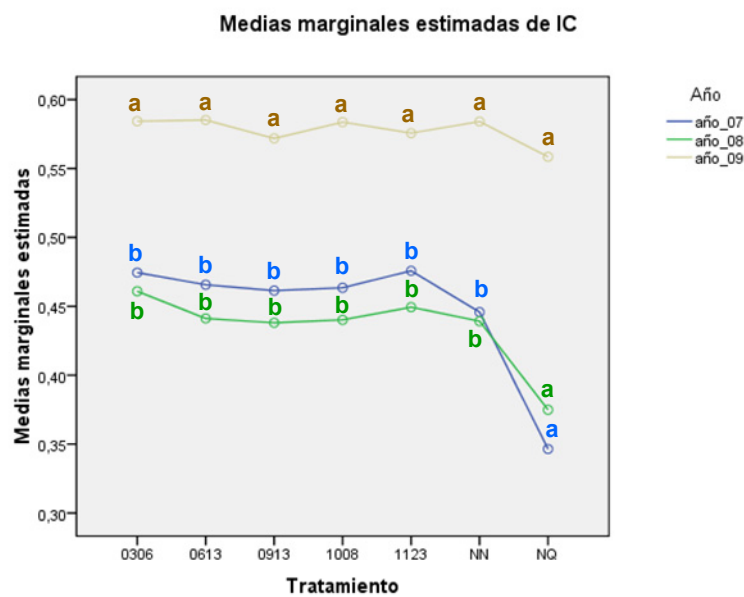


Figura 42. Valores medios del índice de cosecha por tratamiento de inoculación y suelo en el microcosmos.

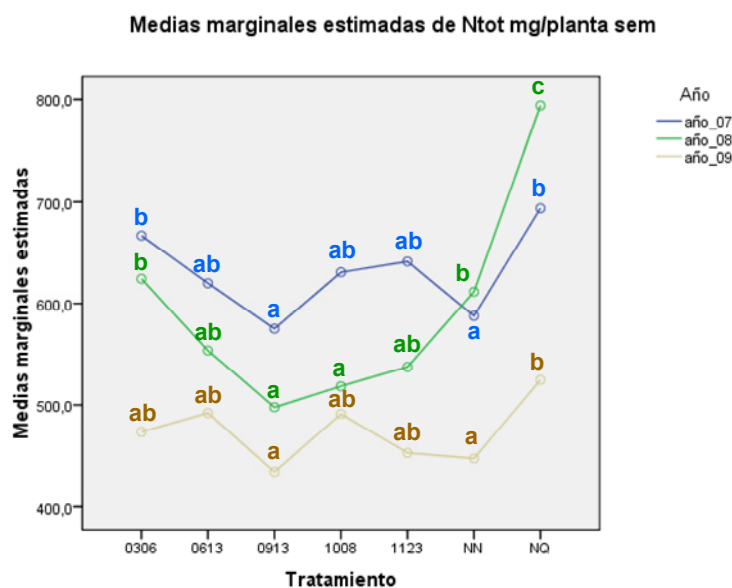


Figura 43. Valores medios del N total en semillas (mg planta⁻¹) por tratamiento de inoculación y suelo en el microcosmos.

4.5.2.2.3. Análisis de las interacciones triples

Las interacciones triples surgieron en todas las variables dependientes excepto el número de semillas por vaina y el rendimiento de semillas por planta.

La interacción triple en la biomasa aérea de las plantas se debe a que en 2009 no hay en ningún suelo respuesta a la inoculación, frente a 2008, donde sí hubo diferencias, que se manifestaron en que el suelo de ESTIA algunos inóculos produjeron la misma biomasa que el control con N. Esto se tradujo en que a nivel del IC en el año 2009 no hubo diferencias entre tratamientos en ningún suelo, mientras que los años previos sí tuvieron diferencias. Por lo general, el IC se mejoró con la inoculación en las plantas del suelo ESTIA en 2007 y en las del suelo Sueros en 2008. En ambos casos, los valores más elevados para el IC lo produjo la inoculación con LCS0306 y LBM1123.

La interacción entre ambiente, suelo e inoculación a nivel de acumulación de N en semillas se debe a que en 2009 sólo hay diferencias significativas en el suelo de ESTIA, en 2007 no hay diferencias en ninguno de ellos y en 2008 hay menor acumulación de N en semillas en las plantas inoculadas frente a los controles, a excepción de las plantas inoculadas con LCS0306 que llegaron a niveles de N similares a los del control con N.

4.5.3. Discusión de los resultados del experimento de microcosmos

El experimento de microcosmos en los años 2007 y 2008 se estableció entre los meses de mayo a septiembre, sin embargo, en 2009 se estableció entre febrero y junio. A pesar de

que el cultivo se hizo en invernadero, las diferencias de los condicionantes climáticos entre los años fueron importantes, y probablemente responsables de las diferencias de desarrollo entre años. El desarrollo de la biomasa aérea fue menor el año de la siembra más temprana, y el índice de cosecha alcanzó sus valores máximos este año. Sin embargo, el rendimiento de semilla fue el más bajo, aunque sin diferencias en uno de los años de siembra más temprana, concretamente 2008. Otro aspecto que puede tener una gran influencia en el desarrollo vegetal es el cambio de hábito de las leguminosas cuando se modifican las condiciones ambientales. Kim & Okubo (1995) observaron en la leguminosa *Lablab purpureus* (tribu Phaseolae) que el cambio de hábito a indeterminado es influenciado por una combinación de temperaturas diurnas y de duración del fotoperíodo, sin embargo encontraron un límite de temperatura para que esto ocurriera (20 °C). Sin embargo, no realizaron un análisis de la influencia que la nodulación podría tener en este cambio de hábito, ni tampoco de la influencia del cambio de hábito en la nodulación, aunque Buttery *et al.* (1997) no observaron interacciones entre los tratamientos de inoculación y los cultivares de alubia empleados en su estudio en el crecimiento y desarrollo de la planta. Estudios como los llevados a cabo por Filek *et al.* (1997) o Silim & Saxena (1992) encontraron que tanto los cultivares de hábito determinado como indeterminado de *Vicia faba* tienen un potencial similar de nodulación, por lo que no cabría esperar un cambio en el establecimiento de la relación simbiótica debido a un cambio de hábito de crecimiento.

El cambio de hábito que se produjo en las plantas de alubia durante los tres años del experimento fue menos pronunciado en 2009, debido a que las temperaturas alcanzadas en el invernadero y en el suelo fueron más bajas, más similares a las condiciones de campo. Sin embargo, las plantas inoculadas no presentaron ningún tipo de respuesta en 2009, ni rendimientos menores que el control con N, aunque mantuvieron una tendencia a valores de rendimiento e IC más elevados que los del control sin N en 2009 y también en 2007.

Por otra parte, el inóculo LPZ0913 se mostró en la mayoría de los casos o bien inóculo inefectivo o incapaz de sobrevivir en estas condiciones ambientales. La inoculación con LPZ0913 y ZBM1008 en 2008 presentó un efecto negativo en el desarrollo vegetal, que podría ser atribuible a la inversión energética que supuso para la planta la nodulación frente a la rentabilidad reducida que obtuvo, de forma que el control sin N fue capaz de presentar crecimiento y producción de semillas mayores que las plantas inoculadas con esos aislados, aunque también podría ser atribuible a las elevadas temperaturas, ya que pueden ser una limitación a la nodulación de la alubia (Graham, 1981).

Las diferencias entre los controles en 2007 y 2008 fueron mayores en el suelo de Sueros que en el de ESTIA, pese a la población de rizobios del primero, lo que implica que los rizobios nativos no pudieron compensar la falta de N en el control sin abonado nitrogenado,

y por otro lado podría ser debido a la aceleración de la mineralización de la materia orgánica del suelo de ESTIA, cuyo contenido es sensiblemente mayor que en el suelo de Sueros.

La tendencia a rendimientos similares a los del control con N con los aislados LCS0306, LBM1123 y ZBM1008 (en 2007) hizo que fueran seleccionados para ser empleados como inóculos en el experimento de campo.

4.6. Experimento de campo

En el experimento de campo se llevó a cabo durante los años 2008 y 2009 en las localidades de Sueros de Cepeda (Sueros) y en León (ESTIA). En los tratamientos de inoculación se emplearon los inóculos LCS0306, ZBM1008 y LBM1123, con buenos resultados en el experimento de microcosmos (en el año 2007), junto con los controles con N y sin N. Los sistemas de laboreo bajo los cuales se estableció el experimento fueron la siembra directa (SD) (en la ESTIA), el laboreo convencional (LC) y el laboreo convencional con una cubierta de centeno semienterrada antes de la siembra de la alubia (CC).

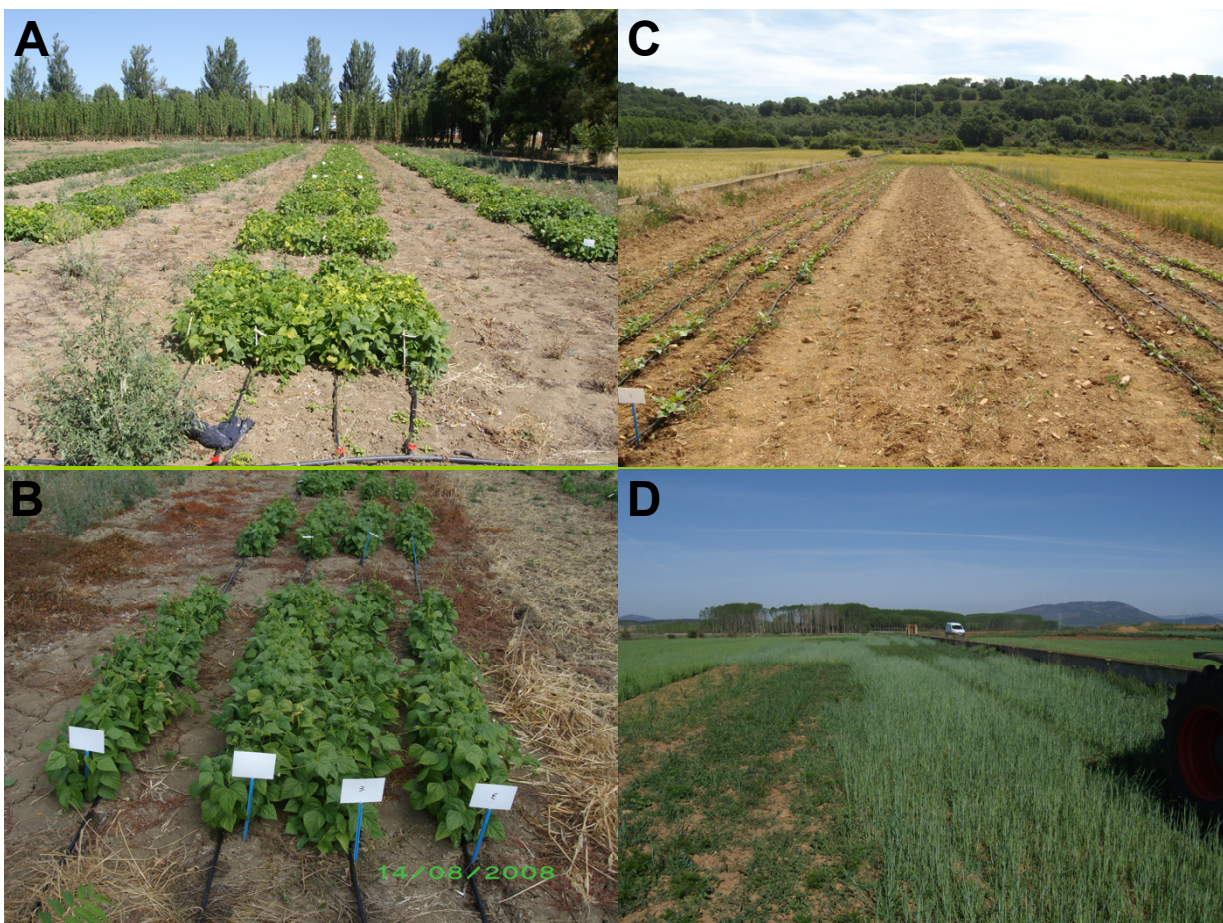


Figura 44. Experimento de campo: (A) visión general del experimento en ESTIA; (B) subparcela con el tratamiento de inoculación en la ESTIA; (C) experimento en Sueros; (D) estado del centeno en el momento de su enterrado en Sueros (en bloques al azar).

Al final del ciclo de crecimiento de la alubia (figura 44) se recogieron diez plantas de cada subparcela, de las cuales se obtuvieron los datos que se analizaron estadísticamente.

Las variables dependientes analizadas fueron el rendimiento de semillas de cada planta (g planta^{-1}), la biomasa aérea y el índice de cosecha (IC), y otras variables relacionadas con el rendimiento fueron el número de semillas por vaina y de vainas por planta, el N total contenido en las semillas (g planta^{-1}) y el peso de 1000 semillas (g).

4.6.1. Análisis de la varianza combinado de ambientes y tratamientos

El análisis de los resultados consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de las variables dependientes biomasa aérea, índice de cosecha, rendimiento y sus componentes considerando como factores el ambiente y los tratamientos del sistema de laboreo (correspondiente a la parcela principal) y la inoculación (correspondiente a la subparcela).

La tabla 48 muestra los datos del análisis de varianza combinado para el conjunto de ambientes y tratamientos. Las tablas 49, 50 y 51 presentan la misma información de los ANOVA para cada ambiente de forma independiente.

La tabla 52 muestra la comparación de los valores medios de las variables dependientes analizadas para las variables independientes ambiente y tratamientos, mostrando la agrupación obtenida según la prueba *post hoc* de la diferencia mínima significativa (DMS) para $p < 0,05$.

Tabla 48. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en tres ambientes diferentes

	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)			Índice de Cosecha			Vainas por planta			Semillas por vaina		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
Ambiente	1206876,189	1782,222	0,000	95,505	4940,87	0,000	101827,421	1833,654	0,000	6993,140	1838,097	0,000
Bloque	1202090,771	1742,464	0,000	94,757	4445,303	0,000	101115,547	1760,906	0,000	6876,033	1670,782	0,000
Análisis de parcela principal												
Laboreo	1216795,461	1869,575	0,000	94,789	4464,457	0,000	101986,41	1850,583	0,000	6879,658	1675,581	0,000
Ambiente*Laboreo	5340,639	8,457	0,000	0,052	2,713	0,044	240,251	4,496	0,004	22,176	5,905	0,001
Análisis de subparcela												
Inoculación	724211,199	1068,163	0,000	56,88	2678,164	0,000	60866,781	1074,454	0,000	4126,400	1001,724	0,000
Ambiente*Inoculación	1620,352	2,460	0,012	0,026	1,369	0,206	79,403	10453	0,170	1,203	0,314	0,961
Laboreo*Inoculación	2396,453	3,822	0,000	0,036	1,724	0,089	130,305	2,419	0,014	5,174	1,260	0,261
Ambiente*Laboreo*Inoculación	1269,320	2,124	0,013	0,041	2,199	0,010	159,297	3,118	0,000	4,084	1,085	0,369

Tabla 48. CONTINUACIÓN

	Peso 1000 semillas (g)			Rendimiento (g planta ⁻¹)			N en semillas (mg planta ⁻¹)		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
Ambiente	8,362 10 ⁷	1167,433	0,000	328926,545	1257,582	0,000	3,976 10 ⁸	1149,898	0,000
Bloque	8,181 10 ⁷	1069,962	0,000	324617,140	1189,093	0,000	3,967 10 ⁸	1139,101	0,000
Análisis de parcela principal									
Laboreo	8,196 10 ⁷	1067,848	0,000	327916,673	1241,001	0,000	4,006 10 ⁸	1185,308	0,000
Ambiente*Laboreo	307369,581	4,362	0,005	4533,764	3,706	0,011	1859665,628	5,611	0,001
Análisis de subparcela									
Inoculación	4,908 10 ⁷	640,838	0,000	195486,614	723,209	0,000	2,385 10 ⁸	688,041	0,000
Ambiente*Inoculación	24067,309	0,333	0,953	381,929	1,485	0,158	559685,478	1,638	0,110
Laboreo*Inoculación	21166,174	0,276	0,974	501,987	1,937	0,051	606580,496	1,819	0,070
Ambiente*Laboreo*Inoculación	26544,038	0,369	0,974	149,319	0,369	0,974	761818,266	2,363	0,005

Tabla 49. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en el ambiente ESTIA 2008

	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)			Índice de Cosecha			Vainas por planta			Semillas por vaina		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
LABOREO	18718,144	23,036	0,000	0,066	2,160	0,117	818,055	11,106	0,000	1862,011	3463,575	0,000
INOCULACIÓN	2539,693	3,125	0,015	0,076	2,491	0,043	58,336	0,792	0,531	1115,719	1991,922	0,000
LABOREO x INOCULACIÓN	1716,207	2,112	0,034	0,073	2,376	0,017	206,224	2,800	0,005	0,231	0,424	0,907

Tabla 49. CONTINUACIÓN

	Peso 1000 semillas (g)			Rendimiento (g planta ⁻¹)			N en semillas (mg planta ⁻¹)		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
LABOREO	2132,845	0,060	0,941	3704,468	10,801	0,000	5,976 10 ⁶	11,741	0,000
INOCULACIÓN	24307,852	0,689	0,600	250,198	0,729	0,572	502601,495	0,987	0,414
LABOREO x INOCULACIÓN	17662,745	0,501	0,855	608,917	1,775	0,081	802679,013	1,577	0,130

Tabla 50. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en el ambiente ESTIA 2009

	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)			Índice de Cosecha			Vainas por planta			Semillas por vaina		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
LABOREO	3727,853	6,837	0,001	0,027	1,488	0,227	213,662	5,280	0,005	3704,699	430,406	0,000
INOCULACIÓN	923,002	1,693	0,151	0,008	0,436	0,782	77,614	1,918	0,106	2209,769	251,317	0,000
LABOREO x INOCULACIÓN	1473,812	2,703	0,007	0,020	1,075	0,379	92,543	2,287	0,021	10,792	1,250	0,268

Tabla 50. CONTINUACIÓN

	Peso 1000 semillas (g)			Rendimiento (g planta ⁻¹)			N en semillas (mg planta ⁻¹)		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
LABOREO	831319,645	5,739	0,003	1028,702	4,689	0,010	1,707 10 ⁶	6,587	0,002
INOCULACIÓN	24840,735	0,171	0,953	357,913	1,631	0,165	179287,694	0,692	0,598
LABOREO x INOCULACIÓN	45545,030	0,314	0,961	394,301	1,797	0,076	464912,184	1,794	0,076

Tabla 51. Resultados del ANOVA combinado para las variables dependientes analizadas en el experimento de alubia Riñón en campo para los tratamientos de laboreo e inoculación en el ambiente Sueros2009

	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)			Índice de Cosecha			Vainas por planta			Semillas por vaina		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
LABOREO	2275,465	5,647	0,018	0,001	0,240	0,625	115,320	3,005	0,084	2179,512	3875,420	0,000
INOCULACIÓN	3216,591	7,982	0,000	0,015	3,164	0,014	258,688	6,740	0,000	873,147	1601,045	0,000
LABOREO x INOCULACIÓN	1455,333	3,611	0,007	0,007	1,480	0,208	82,128	2,140	0,076	1,123	2,083	0,083

Tabla 51. CONTINUACIÓN

	Peso 1000 semillas (g)			Rendimiento (g planta ⁻¹)			N en semillas (mg planta ⁻¹)		
	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p	Media cuadrát	F	p
LABOREO	3662,968	0,417	0,519	435,691	2,800	0,095	416738,754	2,308	0,130
INOCULACIÓN	4838,304	0,550	0,699	1208,883	7,768	0,000	1,118 10 ⁶	6,192	0,000
LABOREO x INOCULACIÓN	4091,490	0,465	0,761	607,403	3,903	0,004	671619,746	3,720	0,006

Tabla 52. Comparación de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en campo para los ambientes, los tipos de laboreo y los tratamientos de inoculación (prueba DMS, p<0,05, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente)

	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)		Índice de Cosecha		Vainas por planta		Semillas por vaina		Peso de 1000 semillas (g)		Rendimiento (g planta ⁻¹)		N en semillas (mg planta ⁻¹)	
	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS
AMBIENTE														
Sueros2009	60,86	b	0,54	b	18,66	b	3,81	a	471,84	b	33,19	c	1090,47	b
ESTIA2009	57,57	b	0,53	b	15,43	a	4,96	b	537,83	c	30,78	b	1054,34	b
ESTIA2008	51,56	a	0,44	a	15,66	a	3,82	a	375,18	a	24,51	a	936,44	a
LABOREO														
SD	50,49	a	0,49	a	14,82	a	4,32	a	486,39	b	26,02	a	951,26	a
LC	64,65	b	0,50	ab	18,34	b	4,13	a	438,02	a	33,36	b	1167,25	b
CC	52,45	a	0,51	b	15,50	a	4,36	a	477,55	b	27,60	a	933,57	a
INOCULACIÓN														
C sin N	49,33	a	0,50	ab	14,78	a	4,17	a	460,69	a	25,43	a	906,22	a
C con N	58,25	b	0,48	a	16,13	ab	4,31	a	467,64	a	29,20	b	1073,72	b
LCS0306	60,00	b	0,50	ab	17,52	b	4,28	a	458,52	a	31,22	b	1071,62	b
ZBM1008	56,31	b	0,51	b	16,28	b	4,22	a	466,04	a	29,66	b	1021,93	b
LBM1123	58,23	b	0,51	b	17,10	b	4,36	a	474,89	a	31,02	b	1048,77	b

Se observaron diferencias significativas para ambiente, laboreo e inoculación en todas las variables dependientes analizadas (tabla 48). En cuanto a las interacciones, fueron significativas algunas de ellas, como la interacción entre el ambiente y el laboreo para todas las variables (tabla 48 y figuras de la 45 a la 51). La interacción entre el ambiente y el tratamiento de inoculación fue significativa para la biomasa aérea (tabla 48 y figura 52) y la interacción entre laboreo e inoculación para la biomasa aérea y número de vainas (tabla 48 y figuras 53 y 54). Las interacciones triples entre ambiente, laboreo e inoculación se dieron en las variables biomasa aérea, índice de cosecha, número de vainas por planta y nitrógeno acumulado en semillas (tabla 48).

La producción de biomasa aérea fue superior en los ambientes de 2009 frente al de 2008 (tabla 52) y en el LC frente a CC y SD. Las plantas inoculadas y las abonadas con N produjeron mayor cantidad de biomasa que el control sin N.

El IC en los ambientes de 2009 fue superior al de 2008. En CC fue superior a SD, con valores intermedios para LC. Entre tratamientos de inoculación, los inóculos ZBM1008 y LBM1123 produjeron valores de IC superiores al control con N.

El número de vainas por planta fue superior en Sueros 2009 frente a los ambientes de ESTIA. Se obtuvieron más vainas por planta en el LC y en los tratamientos inoculados frente al control sin N.

El número de semillas por vaina fue superior en ESTIA 2009 frente a los otros ambientes.

El tamaño medio de las semillas fue diferente en los tres ambientes, máximo en ESTIA 2009, intermedio en Sueros 2009 y mínimo en ESTIA 2008. En SD y CC las semillas fueron más grandes que en LC.

El rendimiento más elevado se obtuvo en Sueros 2009 y el más bajo en ESTIA 2008, alcanzando ESTIA 2009 un rendimiento intermedio y diferente de ambos.

Los rendimientos de la SD y del CC fueron significativamente más bajos que los del LC. Entre tratamientos de inoculación, el rendimiento fue superior en las plantas inoculadas y en las abonadas con N con respecto al control sin N.

Para el N en semillas, los valores de 2009 fueron superiores a los de 2008, y los del LC superiores a los demás laboreos. Con la inoculación se obtuvieron valores similares a los del abonado con N y todos ellos superiores al del tratamiento sin N ni inoculación.

4.6.2. Análisis de las interacciones entre variables independientes

La tabla 53 muestra las comparaciones de medias dentro de cada sistema de laboreo para los diferentes ambientes y los tratamientos de inoculación.

Tabla 53. Comparaciones de los valores medios de las variables dependientes en el experimento de alubia Riñón en campo durante 2008 y 2009 para los tratamientos de inoculación por tipo de laboreo en campo los años 2008 y 2009 (prueba DMS, $p < 0,05$)

	Biomasa aérea (g planta ⁻¹)		Índice de Cosecha		Vainas por planta		Semillas por vaina		Peso de 1000 semillas (g)		Rengimiento (g planta ⁻¹)		N en semillas (mg planta ⁻¹)	
	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS	Media	DMS
SD¹														
ESTIA 2008	56,24		0,46		15,05		3,77		377,86		22,55		861,75	
ESTIA 2009	44,73		0,51		14,60		4,87		594,91		29,49		1040,77	
LC														
ESTIA 2008	68,01	a	0,42	a	19,15	b	4,05	a	369,60	a	31,46	a	1218,44	a
ESTIA 2009	63,08	a	0,54	b	16,77	a	4,52	b	453,63	b	33,79	a	1167,17	a
Sueros 2009	63,61	a	0,54	b	19,28	b	3,81	a	475,33	b	34,40	a	1127,74	a
CC														
ESTIA 2008	44,01	a	0,44	a	13,56	a	3,65	a	377,28	a	20,12	a	752,61	a
ESTIA 2009	53,38	b	0,54	b	14,47	a	5,48	b	564,96	c	29,05	b	955,08	b
Sueros 2009	58,10	b	0,54	b	18,04	b	3,81	a	468,34	b	31,98	b	1053,20	b
SD														
C sin N	50,59	ab	0,47	ab	15,43	a	4,01	a	506,55	a	25,49	a	966,16	a
C con N	55,24	b	0,43	a	14,35	a	4,29	a	480,29	a	26,94	a	1049,88	a
LCS0306	45,29	a	0,51	b	13,80	a	4,42	a	480,27	a	24,11	a	884,37	a
ZBM1008	50,99	ab	0,52	b	14,60	a	4,48	a	494,42	a	27,33	a	926,34	a
LBM1123	50,31	ab	0,49	ab	15,93	a	4,38	a	470,39	a	26,21	a	929,53	a
LC														
C sin N	54,37	a	0,49	a	15,66	a	3,91	a	437,57	a	27,21	a	981,26	a
C con N	61,27	ab	0,51	a	17,95	ab	3,99	ab	449,14	a	31,65	a	1176,86	ab
LCS0306	76,12	c	0,49	a	21,23	b	4,23	b	429,36	a	38,75	b	1336,83	b
ZBM1008	63,44	b	0,50	a	17,82	ab	4,33	b	430,62	a	32,50	ab	1128,60	ab
LBM1123	67,29	b	0,53	a	18,80	b	4,20	ab	444,61	a	36,51	b	1199,48	b
CC														
C sin N	43,71	a	0,52	a	13,51	a	4,52	ab	450,84	a	23,71	a	794,16	a
C con N	57,24	b	0,49	a	15,50	ab	4,67	b	477,48	a	28,21	b	977,19	b
LCS0306	53,17	b	0,51	a	16,19	b	4,24	ab	474,42	a	28,20	b	919,40	ab
ZBM1008	53,09	b	0,51	a	15,95	b	3,93	a	480,66	a	28,51	b	984,84	b
LBM1123	55,80	b	0,51	a	16,40	b	4,49	ab	505,13	a	29,54	b	999,38	b

¹ Para la variable independiente Ambiente bajo el laboreo SD, los valores promedio de todas las variables dependientes fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$)

4.6.2.1. Interacciones entre el ambiente y el laboreo

La interacción entre ambiente y laboreo se observó en todas las variables.

La producción de biomasa aérea (figura 45) resultó beneficiada en el LC en el ambiente ESTIA 2008 frente a los otros laboreos, en los que fue perjudicada. Esta interacción a nivel de biomasa tuvo su reflejo en el IC (figura 46), resultando perjudicado en LC en el ambiente ESTIA 2008, lo que supone que la producción de biomasa no se vio correspondida con una producción de semillas tan alta. Además en la SD el IC fue superior al de los otros laboreos en ESTIA 2008 e inferior a ellos en ESTIA 2009.

El número de vainas por planta también fue beneficiado en el LC en ESTIA2008 frente a los otros dos laboreos (figura 47).

El número de semillas por vaina (figura 48) resultó favorecido por el laboreo CC en ESTIA 2009 y perjudicado en ESTIA 2008, lo contrario de lo que sucedió en el LC.

El rendimiento (figura 50) y el N total en semillas (figura 51) fueron en general más bajos en ESTIA2008, pero el LC resultó menos perjudicado que los demás laboreos, por el mayor número de vainas por planta.

Esta interacción demuestra que el ambiente ESTIA 2008 fue claramente desfavorable, pero el LC resultó poco perjudicado.

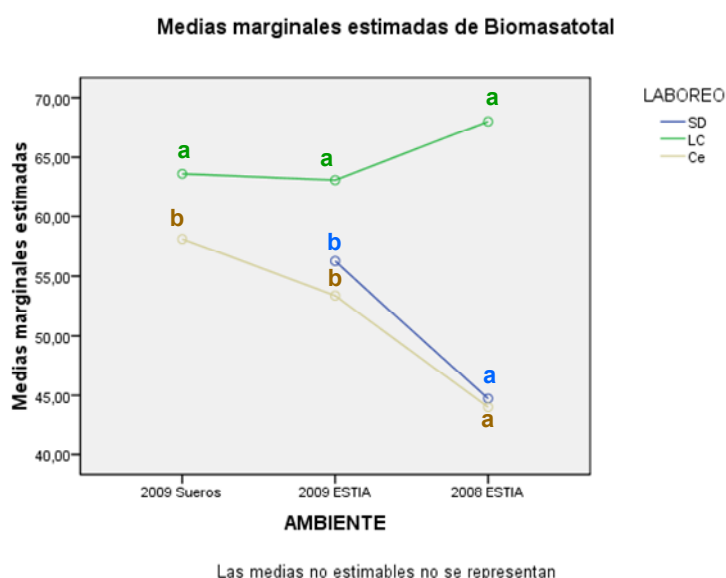


Figura 45. Valores medios de la biomasa aérea (g) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

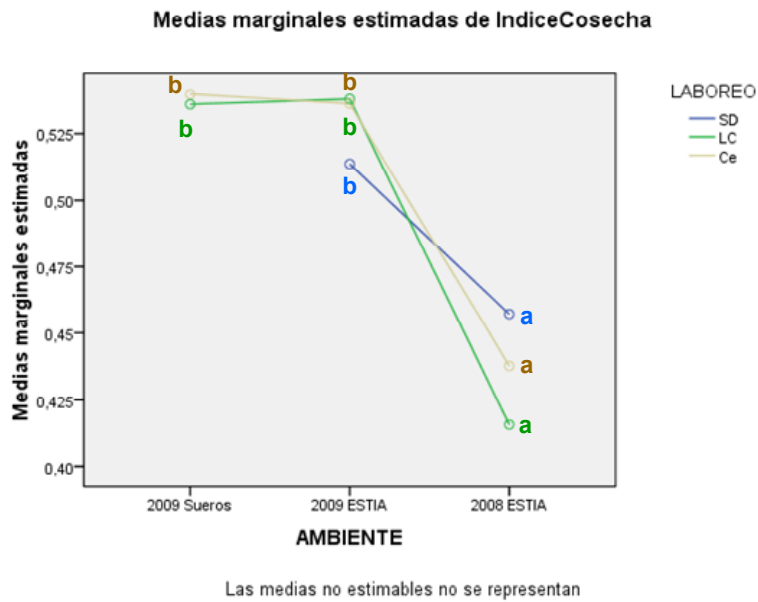


Figura 46. Valores medios del índice de cosecha para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

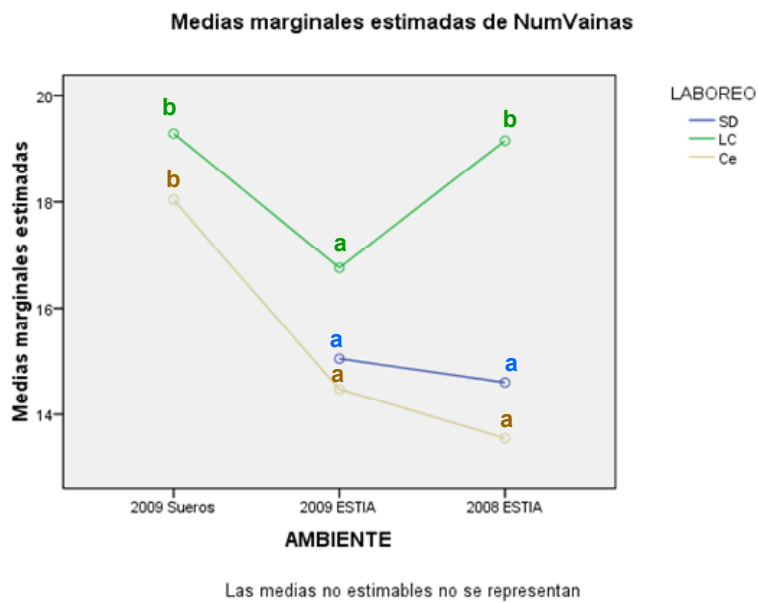


Figura 47. Valores medios del número de vainas por planta para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

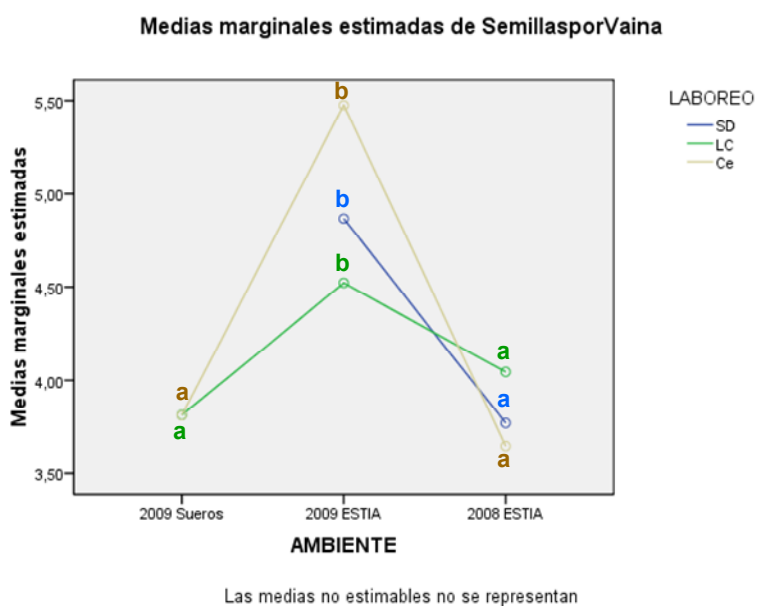


Figura 48. Valores medios del número de semillas por vaina para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

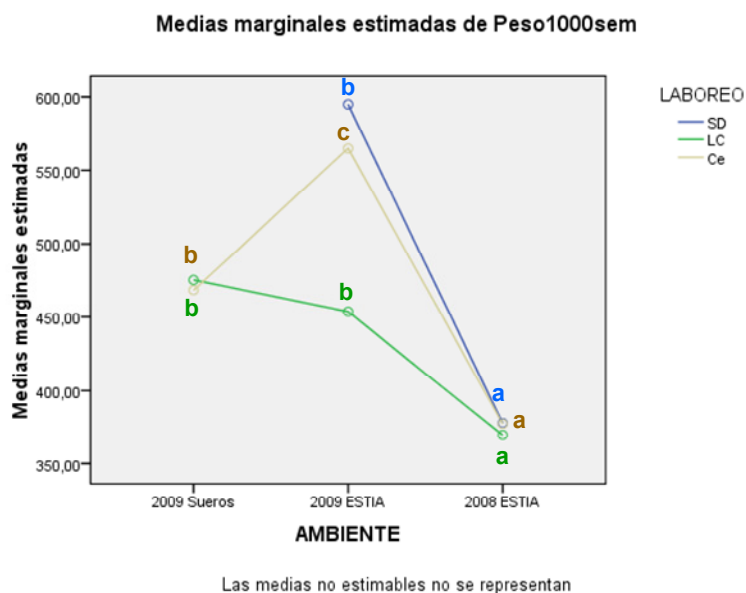


Figura 49. Valores medios del peso de 1000 semillas (g) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

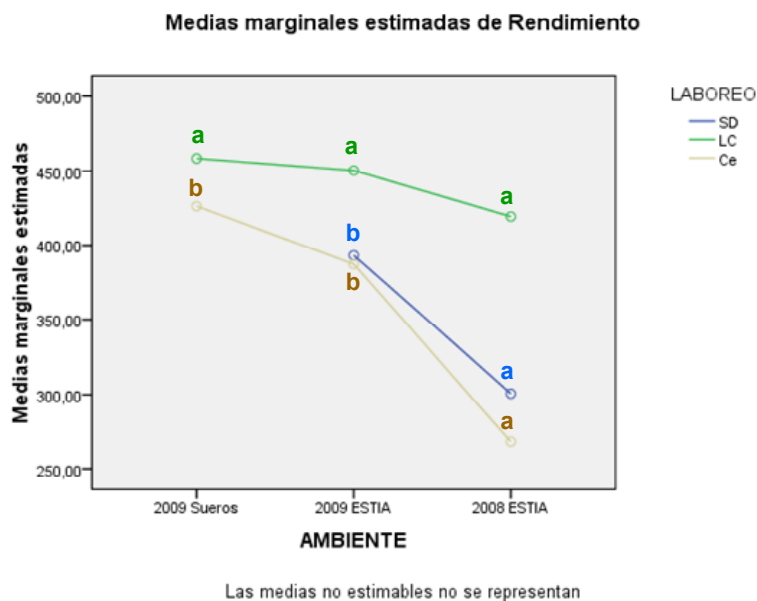


Figura 50. Valores medios del rendimiento (g m^{-2}) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

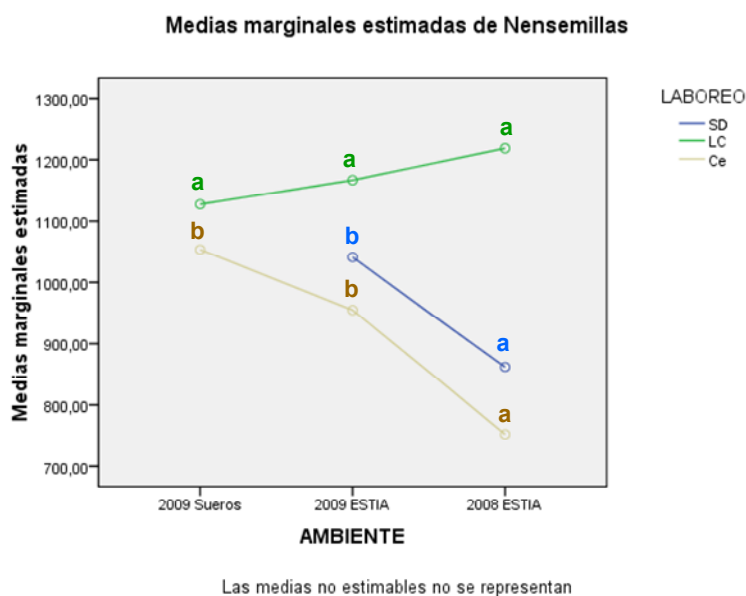


Figura 51. Valores medios del N acumulado en semillas (mg planta^{-1}) para los distintos laboreos por ambientes. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

4.6.2.2. Interacciones entre el ambiente y la inoculación

Hubo interacción entre ambiente y tratamiento de inoculación para la biomasa aérea (figura 52). La biomasa aérea de plantas inoculadas fue igual o superior a las fertilizadas con N en 2009, mientras que para alguno de los inóculos fue inferior en 2008.

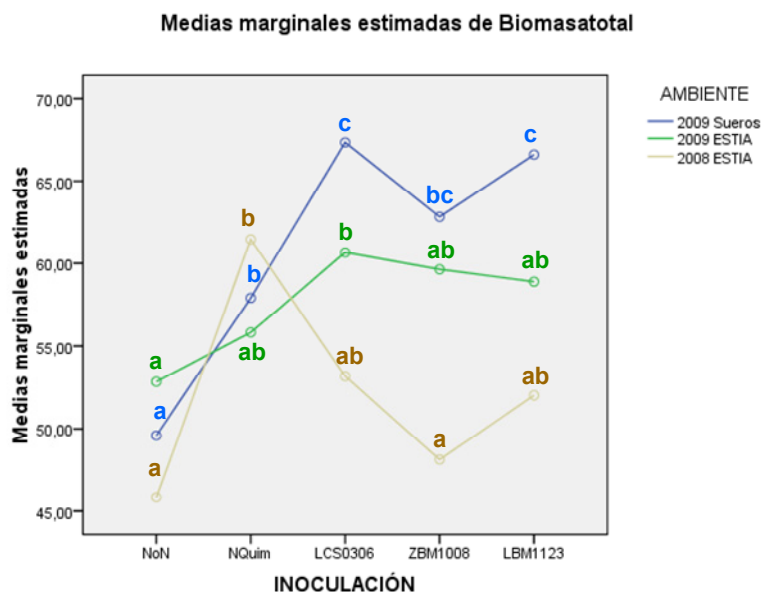


Figura 52. Valores medios de la bimoasa aérea (g) para los distintos ambientes por tratamiento de inoculación. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre ambientes

4.6.2.3. Interacciones entre el laboreo y la inoculación

La interacción entre laboreo e inoculación se observó en la biomasa aérea y en el número de vainas por planta. La inoculación tuvo mayor efecto en el LC en cuanto a la producción de biomasa aérea (figura 53) y número de vainas (figura 54) frente a los otros laboreos.

En estas gráficas de interacciones entre tratamiento de inoculación y ambientes y laboreos se observa que el inóculo LCS0306 produce valores más altos de biomasa y vainas que el resto de inóculos y controles, en especial en LC.

4.6.2.4. Análisis de las interacciones triples

Las tablas 54, 55 y 56 muestran las comparaciones de medias dentro de cada ambiente para los tipos de laboreo y tratamientos de inoculación. La comparación se hizo mediante la prueba *post hoc* de Tukey por ser más estricta en la significación de las diferencias, de forma que facilita la interpretación de las interacciones. Las variables dependientes para las que hubo interacciones triples se deducen de la tabla 48.

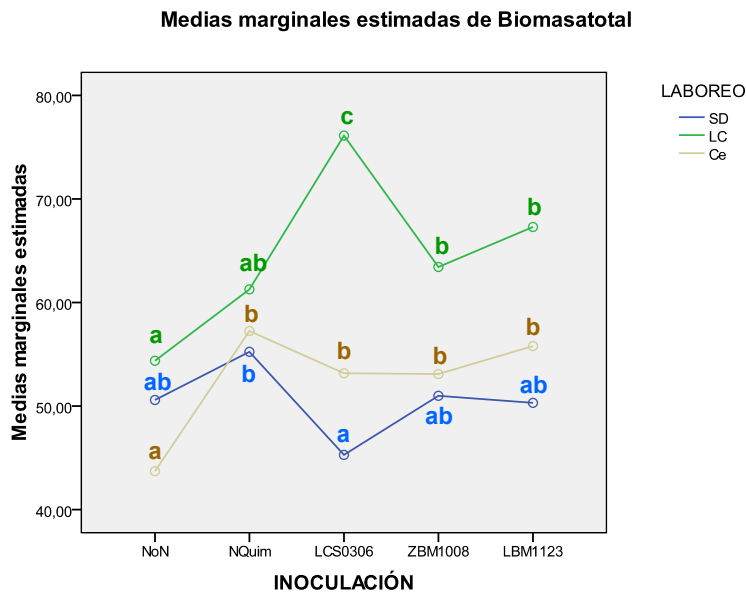


Figura 53. Valores medios de la biomasa aérea (g) para los distintos laboreos por tratamiento de inoculación. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre laboreos

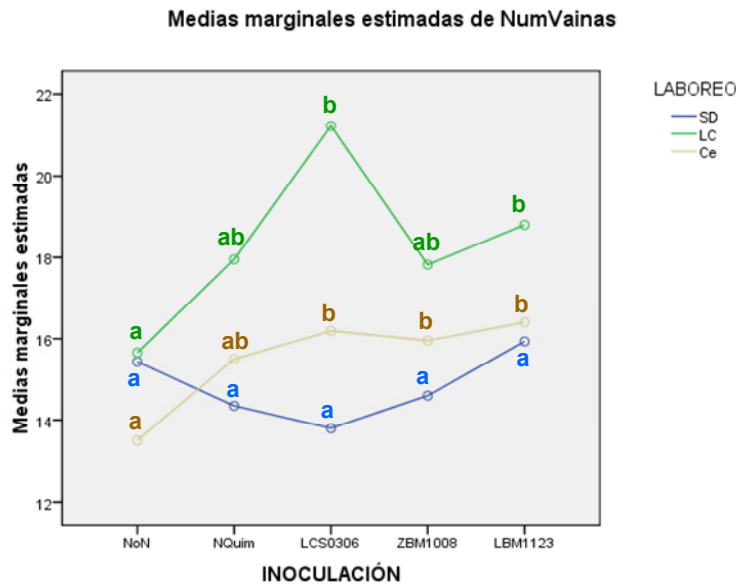


Figura 54. Valores medios del número de vainas para los distintos laboreos por tratamiento de inoculación. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre laboreos

Tabla 54. Comparaciones de valores medios de las variables dependientes para los tratamientos de laboreo e inoculación en ESTIA 2008 (prueba de Tukey, $p < 0,05$)

Parámetro	Inóculo / Laboreo	SD	LC	CC	Promedio
Biomasa aérea (g)	C sin N	46,80 ^a _{AB}	57,28 ^a _B	33,43 ^a _A	45,15 ^a
	C con N	49,76 ^a _A	80,83 ^a _B	53,75 ^b _A	61,60 ^b
	LCS0306	37,14 ^a _A	79,14 ^a _B	43,20 ^{ab} _A	54,00 ^{ab}
	ZBM1008	44,30 ^a _A	54,00 ^a _A	46,12 ^{ab} _A	47,78 ^a
	LBM1123	45,66 ^a _A	62,54 ^a _A	47,83 ^{ab} _A	50,08 ^{ab}
	Promedio	44,73 ^A	68,01 ^B	44,01 ^A	51,56
Índice de Cosecha	C sin N	0,43 ^{ab} _{AB}	0,38 ^a _A	0,51 ^b _B	0,44 ^{ab}
	C con N	0,39 ^a _A	0,45 ^a _A	0,31 ^a _A	0,39 ^a
	LCS0306	0,50 ^{ab} _A	0,41 ^a _A	0,42 ^{ab} _A	0,45 ^{ab}
	ZBM1008	0,53 ^b _A	0,43 ^a _A	0,45 ^{ab} _A	0,47 ^b
	LBM1123	0,44 ^{ab} _A	0,39 ^a _A	0,44 ^{ab} _A	0,43 ^{ab}
	Promedio	0,46 ^A	0,42 ^A	0,44 ^A	0,44
Vainas por Planta	C sin N	16,10 ^a _A	15,91 ^a _A	12,11 ^a _A	14,68 ^a
	C con N	12,97 ^a _A	23,28 ^a _B	13,50 ^a _A	16,72 ^a
	LCS0306	13,33 ^a _A	22,60 ^a _B	13,13 ^a _A	16,63 ^a
	ZBM1008	14,70 ^a _A	15,42 ^a _A	14,07 ^a _A	14,70 ^a
	LBM1123	15,90 ^a _A	16,07 ^a _A	15,04 ^a _A	15,64 ^a
	Promedio	14,60 ^A	19,15 ^B	13,56 ^A	15,66
Semillas por Vaina	C sin N	3,70 ^a _A	3,80 ^a _A	3,65 ^a _A	3,71 ^a
	C con N	3,92 ^a _A	4,14 ^a _A	3,69 ^a _A	3,95 ^a
	LCS0306	3,74 ^a _{AB}	4,16 ^a _B	3,52 ^a _A	3,83 ^a
	ZBM1008	3,79 ^a _A	4,03 ^a _A	3,70 ^a _A	3,83 ^a
	LBM1123	3,70 ^a _A	4,02 ^a _A	3,68 ^a _A	3,76 ^a
	Promedio	3,77 ^A	4,05 ^B	3,65 ^A	3,82
Peso de 1000 Semillas (g)	C sin N	392,74 ^a _A	366,02 ^a _A	384,12 ^a _A	382,35 ^a
	C con N	355,38 ^a _A	383,66 ^a _A	302,84 ^a _A	353,50 ^a
	LCS0306	376,18 ^a _A	355,63 ^a _A	386,68 ^a _A	371,66 ^a
	ZBM1008	421,84 ^a _A	373,94 ^a _A	396,41 ^a _A	399,17 ^a
	LBM1123	343,15 ^a _A	372,44 ^a _A	388,68 ^a _A	365,36 ^a
	Promedio	377,86 ^A	369,60 ^A	377,28 ^A	375,18
Rendimiento (g planta ⁻¹)	C sin N	22,60 ^a _A	24,71 ^a _A	17,65 ^a _A	21,50 ^a
	C con N	23,87 ^a _{AB}	39,74 ^a _B	15,93 ^a _A	27,67 ^a
	LCS0306	19,55 ^a _A	36,29 ^a _B	20,85 ^a _A	25,96 ^a
	ZBM1008	25,37 ^a _A	24,55 ^a _A	22,35 ^a _A	24,12 ^a
	LBM1123	21,36 ^a _A	28,99 ^a _A	22,52 ^a _A	23,42 ^a
	Promedio	22,55 ^A	31,46 ^B	20,13 ^A	24,51
N en semillas (mg planta ⁻¹)	C sin N	902,70 ^a _A	1020,25 ^a _A	646,54 ^a _A	847,89 ^a
	C con N	973,23 ^a _{AB}	1596,39 ^a _B	644,94 ^a _A	1118,67 ^a
	LCS0306	775,98 ^a _A	1352,65 ^a _A	727,24 ^a _A	970,91 ^a
	ZBM1008	845,61 ^a _A	968,49 ^a _A	854,39 ^a _A	884,95 ^a
	LBM1123	811,21 ^a _A	1010,72 ^a _A	853,54 ^a _A	869,30 ^a
	Promedio	861,75 ^A	1218,44 ^B	752,61 ^A	936,44

Tabla 55. Comparaciones de valores medios de las variables dependientes para los tratamientos de laboreo e inoculación en ESTIA 2009 (prueba de Tukey, p<0,05)

Parámetro	Inóculo / Laboreo	SD	LC	CC	Promedio
Biomasa aérea (g)	C sin N	54,37 ^a _A	57,57 ^{ab} _A	46,53 ^a _A	52,83 ^a
	C con N	60,72 ^a _A	50,55 ^a _A	56,24 ^a _A	55,83 ^a
	LCS0306	53,43 ^a _A	75,74 ^b _B	52,78 ^a _A	60,65 ^a
	ZBM1008	57,69 ^a _A	62,03 ^{ab} _A	59,19 ^a _A	59,63 ^a
	LBM1123	54,97 ^a _A	69,53 ^{ab} _B	52,19 ^a _A	58,89 ^a
	<i>Promedio</i>	56,26 _A	63,08 _B	53,38 _A	57,57
Índice de Cosecha	C sin N	0,52 ^a _A	0,53 ^a _A	0,54 ^a _A	0,53 ^a
	C con N	0,48 ^a _A	0,56 ^a _A	0,53 ^a _A	0,52 ^a
	LCS0306	0,52 ^a _A	0,52 ^a _A	0,53 ^a _A	0,52 ^a
	ZBM1008	0,51 ^a _A	0,50 ^a _A	0,55 ^a _A	0,52 ^a
	LBM1123	0,53 ^a _A	0,58 ^a _A	0,52 ^a _A	0,54 ^a
	<i>Promedio</i>	0,51 _A	0,54 _A	0,54 _A	0,53
Vainas por Planta	C sin N	14,77 ^a _A	15,30 ^{ab} _A	12,97 ^a _A	14,34 ^a
	C con N	15,73 ^a _A	14,07 ^a _A	13,87 ^a _A	14,56 ^a
	LCS0306	14,27 ^a _A	19,40 ^b _B	14,43 ^a _A	16,03 ^a
	ZBM1008	14,50 ^a _A	15,80 ^{ab} _A	17,00 ^a _A	15,77 ^a
	LBM1123	15,97 ^a _{AB}	19,27 ^b _B	14,10 ^a _A	16,44 ^a
	<i>Promedio</i>	15,05 _{AB}	16,77 _B	14,47 _A	15,43
Semillas por Vaina	C sin N	4,33 ^a _A	4,27 ^a _A	6,08 ^a _B	4,89 ^a
	C con N	4,66 ^a _A	4,43 ^a _A	6,04 ^a _A	5,04 ^a
	LCS0306	5,10 ^a _A	4,57 ^a _A	5,41 ^a _A	5,02 ^a
	ZBM1008	5,18 ^a _A	4,93 ^a _A	4,23 ^a _A	4,78 ^a
	LBM1123	5,06 ^a _A	4,40 ^a _A	5,63 ^a _A	5,03 ^a
	<i>Promedio</i>	4,87 _{AB}	4,52 _A	5,48 _B	4,95
Peso de 1000 Semillas (g)	C sin N	620,36 ^a _A	458,88 ^a _A	473,67 ^a _A	517,64 ^a
	C con N	605,20 ^a _A	464,78 ^a _A	572,40 ^a _A	547,46 ^a
	LCS0306	584,37 ^a _A	453,25 ^a _A	559,82 ^a _A	532,48 ^a
	ZBM1008	567,00 ^a _A	439,13 ^a _A	586,37 ^a _A	530,83 ^a
	LBM1123	597,63 ^a _A	452,11 ^a _A	632,54 ^a _A	560,76 ^a
	<i>Promedio</i>	594,91 _B	453,63 _A	564,96 _B	537,83
Rendimiento (g planta ⁻¹)	C sin N	28,38 ^a _A	30,07 ^a _A	25,85 ^a _A	28,10 ^a
	C con N	30,06 ^a _A	28,18 ^a _A	29,49 ^a _A	29,24 ^a
	LCS0306	28,66 ^a _A	39,62 ^a _B	28,82 ^a _A	32,37 ^a
	ZBM1008	29,30 ^a _A	31,87 ^a _A	33,76 ^a _A	31,64 ^a
	LBM1123	31,07 ^a _{AB}	39,22 ^a _B	27,33 ^a _A	32,54 ^a
	<i>Promedio</i>	29,50 _A	33,80 _B	29,06 _A	30,79
N en semillas (mg planta ⁻¹)	C sin N	1029,62 ^a _A	1062,46 ^a _A	841,05 ^a _A	977,71 ^a
	C con N	1126,53 ^a _A	1046,02 ^a _A	1008,70 ^a _A	1060,42 ^a
	LCS0306	992,77 ^a _A	1357,02 ^a _B	928,89 ^a _A	1092,89 ^a
	ZBM1008	1007,08 ^a _A	1070,66 ^a _A	1116,79 ^a _A	1064,84 ^a
	LBM1123	1047,85 ^a _{AB}	1299,68 ^a _B	879,98 ^a _A	1075,84 ^a
	<i>Promedio</i>	1040,77 _{AB}	1167,17 _B	955,08 _A	1054,34

Tabla 56. Comparaciones de valores medios de las variables dependientes para los tratamientos de laboreo e inoculación en Sueros 2009 (prueba de Tukey, $p < 0,05$)

Parámetro	Inóculo / Laboreo	LC	CC	Promedio
Biomasa total (g)	C sin N	49,05 ^a	50,14 ^a	49,60 ^a
	C con N	55,71 ^{ab}	60,12 ^{ab}	57,91 ^{ab}
	LCS0306	73,48 ^c	61,20 ^{ab}	67,34 ^b
	ZBM1008	72,39 ^c	53,27 ^{ab}	62,83 ^b
	LBM1123	67,43 ^{bc}	65,78 ^b	66,60 ^b
	<i>Promedio</i> ¹	63,61	58,10	60,86
Índice de Cosecha	C sin N	0,53 ^{ab}	0,52 ^a	0,53 ^{ab}
	C con N	0,50 ^a	0,54 ^a	0,52 ^a
	LCS0306	0,55 ^b	0,54 ^a	0,55 ^{ab}
	ZBM1008	0,55 ^b	0,53 ^a	0,54 ^{ab}
	LBM1123	0,56 ^b	0,56 ^a	0,56 ^b
	<i>Promedio</i>	0,54	0,54	0,54
Número Vainas por Planta	C sin N	15,83 ^a	15,30 ^a	15,57 ^a
	C con N	17,40 ^{ab}	18,20 ^{ab}	17,80 ^{ab}
	LCS0306	21,70 ^b	20,30 ^b	21,00 ^c
	ZBM1008	21,77 ^b	16,60 ^{ab}	19,18 ^{bc}
	LBM1123	19,70 ^{ab}	19,80 ^b	19,75 ^{bc}
	<i>Promedio</i>	19,28	18,04	18,66
Semillas por Vaina	C sin N	3,64 ^{ab}	3,74 ^a	3,69 ^a
	C con N	3,43 ^a	3,84 ^a	3,63 ^a
	LCS0306	3,95 ^b	3,63 ^a	3,79 ^a
	ZBM1008	3,96 ^b	3,83 ^a	3,90 ^a
	LBM1123	4,08 ^b	4,02 ^a	4,05 ^a
	<i>Promedio</i>	3,81	3,81	3,81
Peso de 1000 Semillas (g)	C sin N	468,74 ^a	488,07 ^a	478,40 ^a
	C con N	488,05 ^a	475,71 ^a	481,88 ^a
	LCS0306	479,22 ^a	456,27 ^a	467,75 ^a
	ZBM1008	467,44 ^a	450,79 ^a	459,12 ^a
	LBM1123	473,20 ^a	470,86 ^a	472,03 ^a
	<i>Promedio</i>	475,33	468,34	471,81
Rendimiento (g planta ⁻¹)	C sin N	26,19 ^a	27,02 ^a	26,61 ^a
	C con N	28,38 ^a	33,48 ^{ab}	30,93 ^{ab}
	LCS0306	40,33 ^b	33,23 ^{ab}	36,78 ^{bc}
	ZBM1008	39,49 ^b	28,82 ^{ab}	34,15 ^{bc}
	LBM1123	37,57 ^b	37,37 ^b	37,47 ^c
	<i>Promedio</i>	34,39	31,98	33,19
N en semillas (mg planta ⁻¹)	C sin N	871,48 ^a	880,14 ^a	875,81 ^a
	C con N	958,09 ^{ab}	1122,89 ^{ab}	1040,49 ^{ab}
	LCS0306	1300,83 ^c	1057,24 ^{ab}	1179,04 ^b
	ZBM1008	1314,64 ^c	970,30 ^{ab}	1142,47 ^b
	LBM1123	1193,67 ^{bc}	1235,44 ^b	1214,56 ^b
	<i>Promedio</i>	1127,74	1053,20	1090,47

La interacción triple entre ambiente, laboreo e inoculación en la variable biomasa aérea se debe a que en el LC no hubo diferencias entre tratamientos de inoculación en 2008 y las hubo en 2009, ya que en ESTIA el inóculo LCS0306 produjo más biomasa que el control con N, y en Sueros además del LCS0306 también el ZBM1008. También hubo interacción en el laboreo CC, ya que en Sueros 2009 el LBM1123 produjo más biomasa aérea que el control sin N mientras en el resto de los ambientes no fue así.

La interacción triple en el índice de cosecha se debe a que en LC en Sueros 2009 se mejoró el IC con todos los inóculos bacterianos con respecto al control con N, lo que no sucedió para ningún laboreo en ESTIA 2009 y en ESTIA 2008 sólo en SD con el aislado ZBM1008.

El número de vainas por planta tuvo una respuesta positiva en ESTIA 2009 en algunos tratamientos inoculados frente al control con N, pero sólo en el LC, mientras que en Sueros 2009 la respuesta positiva fue frente al control sin N para LC y CC. En ESTIA 2008 no hubo respuesta alguna.

La interacción triple en la variable N en semillas es consecuencia de las diferencias en Sueros 2009 en el LC entre los inóculos, siendo LCS0306 y ZBM1008 superiores a ambos controles. En CC las diferencias se dieron entre LBM1123 y el control sin N. No hubo diferencias entre los ambientes de ESTIA.

4.6.3. Discusión de los resultados del experimento de campo

El rendimiento del cultivo de la alubia en el sistema de laboreo convencional LC fue superior al de la SD y el CC. Estos resultados coinciden con los de Silveira *et al.* (2000), quienes observaron que el arado de vertedera y el gradeo produjeron rendimientos superiores a la siembra directa durante seis años de cultivo de alubia en Brasil. De igual modo, Knavel & Herron (1986), en un experimento de dos años, también verificaron producciones superiores bajo LC en veza.

Sin embargo, otros autores han obtenido resultados diferentes, observándose rendimientos superiores bajo SD en ambientes tropicales, probablemente debido al efecto tampón que tiene un suelo cultivado en SD, amortiguando los cambios en tales condiciones edafoclimáticas (Urchei *et al.*, 2000). En cualquier caso, hay resultados contradictorios en relación al sistema de laboreo más adecuado que parecen depender de las condiciones ambientales del lugar donde se desarrollen los experimentos. Stone & Moreira (2000) observaron que el sistema de laboreo afectó significativamente al cultivo de la alubia únicamente en el número de vainas por planta y semillas por vaina, siendo superiores en SD, al contrario de lo que se observó en los experimentos realizados en la ESTIA en este estudio. Silva *et al.* (2004) no observaron ninguna influencia del laboreo en los componentes

del rendimiento de la alubia, lo que relacionaron con la rápida mineralización de la materia orgánica en zonas tropicales, de ahí que los laboreos de conservación no muestren efectos beneficiosos a lo largo del tiempo. En experimentos llevados a cabo en España con *Vicia faba* L. (López-Bellido *et al.*, 2006), la fijación de N₂ tampoco presentó diferencias significativas entre la SD y el LC.

La emergencia de las plantas fue más rápida en la SD frente a los demás laboreos en ambos años (datos no mostrados), aunque eso no se reflejó posteriormente en una mejora del rendimiento. La aplicación de vermiculita portadora del inóculo junto con un buen lecho de siembra podría haber favorecido la emergencia, puesto que se ha visto que la aplicación de sustratos en torno a la semilla mejora la emergencia (Valenciano *et al.*, 2004).

Además, en este estudio no aparecieron diferencias entre los tratamientos de inoculación en la SD, a diferencia de lo sucedido con el LC y el CC. En contraposición, Kessel & Hartley, (2000) observaron un aumento en el potencial de fijación de N₂ en los laboreos de conservación, aunque ese aumento lo vincularon a la reducción del N disponible en el suelo y a la reducción del estrés hídrico. Sin embargo, este potencial beneficio no se manifiesta tan claramente a partir de cierto nivel de fertilidad del suelo (López-Bellido *et al.*, 2006).

En el CC, se produjo una mayor biomasa aérea en el control con N frente a los inóculos en 2008, lo que podría ser consecuencia de la reducción de fertilidad del suelo a corto plazo por la inmovilización de N por el cultivo del centeno. Estas diferencias fueron superiores en 2008 frente a 2009, cuando las condiciones meteorológicas impidieron el roturado del centeno al final del ahijado, y se enterró más tarde, por lo que la inmovilización de N fue mayor. Además, el riego localizado provocaría una ralentización de la mineralización de los restos de centeno. De esta forma, se produjeron diferencias significativas en la biomasa aérea entre los controles bajo CC, lo que no se repitió en los otros laboreos. No obstante, esto no se tradujo en el rendimiento, aunque sí en una bajada del IC del control con N en el CC (diferencias no significativas). La inoculación en condiciones de CC, con una limitación de N mayor que en los otros laboreos, produjo valores de biomasa y rendimiento en semillas similares al control con N.

En 2008 las condiciones climáticas fueron desfavorables por las bajas temperaturas, por lo que el LC presentó los valores de biomasa más elevados, ya que en los otros laboreos, los restos vegetales parecen haber reducido la temperatura del suelo a niveles perjudiciales para el cultivo y que redujeron la tasa de mineralización. Sin embargo, el IC fue menor en el LC ya que la biomasa no se vio compensada con un rendimiento a niveles similares. El cultivo con restos vegetales en 2008 resultó perjudicado frente al suelo sin cubierta, y estas condiciones podrían haber sido la causa de la ausencia de respuesta positiva a la inoculación en la SD, aunque también podría deberse a las diferencias en las poblaciones microbianas del suelo. Ferreira *et al.* (2000) observaron que en SD hubo un aumento de la

materia orgánica y una reducción de la temperatura media del suelo, todo ello beneficioso para la comunidad microbiana del suelo. El número de rizobios de soja fue mayor en la SD, al igual que su diversidad. Además, estos autores observaron que los aislados de mayor eficiencia provenían de la SD. También Hungría *et al.* (1997) observaron en alubia una influencia del laboreo en la población microbiana del suelo. Sin embargo, esto no ocurriría en el suelo ESTIA, ya que a través del Número Más Probable no se observó una presencia significativa de rizobios de alubia, aunque esto puede estar relacionado más con la tradición del cultivo que con el sistema de laboreo.

Kaschuk *et al.* (2006) observaron un número de especies con capacidad de nodulación en alubia mayor en LC y una especialización con menor número de especies en la SD, promovida por la estabilización de las condiciones del suelo.

La inoculación con los aislados seleccionados LCS0306, LBM1123 y ZBM1008 produjo rendimientos similares al del control con N, y superiores al control sin N en los laboreos LC y CC. Esto concuerda con otros estudios de evaluación de inóculos eficientes en fijación de N₂ desarrollados en Canadá, Brasil y España. Así, Nyela *et al.* (2009) obtuvieron rendimientos similares con la inoculación de alubia a los del abonado nitrogenado en Canadá, y valores en el rango de 40-50% del N derivado de la fijación de N₂, similares a los obtenidos en este estudio en el experimento de cultivo hidropónico con los aislados de mayor eficiencia. Del mismo modo, Rodríguez-Navarro *et al.* (2000) observaron en plantas inoculadas rendimientos similares al control con N en lo que consideraron el primer estudio extenso de rizobios autóctonos en España.

Mostasso *et al.* (2002) obtuvieron rendimientos similares al abonado nitrogenado en una selección de rizobios autóctonos de Brasil (*R. tropici*) en un experimento de campo. Hungría *et al.* (2003) obtuvieron, a partir de aislados nativos de alubia, unos rendimientos similares a los del abonado nitrogenado. Hungría *et al.* (2000) también obtuvieron rendimientos similares, y además se observó que con algunos aislados brasileños el rendimiento fue superior al de *R. tropici* SEMIA4077, recomendado como inoculante, demostrando la viabilidad de la selección de cepas autóctonas como base para inoculantes, incluso en suelos con elevadas poblaciones de rizobios nativos.

Sin embargo, en otro estudio, Rodríguez-Navarro *et al.* (1999) sólo observaron un aumento en los índices de cosecha en alubia. Daza *et al.* (2000) observaron un rendimiento equivalente al 66% del del abonado nitrogenado con *R. tropici* CIAT899.

En ESTIA 2008 no hubo un incremento del rendimiento con la inoculación analizando los resultados con la prueba de Tukey (ni la prueba de la mínima diferencia significativa para cada laboreo produjo diferencias, datos no mostrados). En este ambiente sólo el IC de los inóculos LCS0306 y ZBM1008 fue superior al del control con N, de la misma forma que el estudio de Rodríguez-Navarro *et al.* (1999), algo que estos autores vincularon con la

presencia de ureidos a partir de la fijación simbiótica de N_2 , compuestos nitrogenados que favorecen la producción de semillas.

En 2009 hubo diferencias entre los tratamientos, a excepción de la SD. En ESTIA 2009 en el LC el rendimiento fue superior al control con N con los inóculos LCS0306 y LBM1123 (prueba DMS, datos no mostrados), mientras que en el CC sólo ZBM1008 fue superior al control sin N (prueba DMS, datos no mostrados), mientras que en Sueros 2009 en LC los tres inóculos tuvieron un rendimiento superior a los controles, y en CC el inóculo LBM1123 produjo un rendimiento superior al control sin N. Esto puede deberse a que el suelo de ESTIA en 2009 ya había perdido parte de la fertilidad residual que tenía en 2008, con lo que la inoculación se hace incluso más interesante que el abonado nitrogenado en términos de rendimientos.

También es destacable cómo el suelo de Sueros presentó un rendimiento menor en comparación con el de la ESTIA en microcosmos mientras que en el experimento de campo en 2009 los rendimientos en Sueros fueron superiores a los de ESTIA.

La inoculación del cultivo de la alubia presentó, por lo tanto, una respuesta positiva en comparación con la no inoculación a nivel de rendimiento, en los sistemas de laboreo convencionales, pero no ocurrió así en la siembra directa. Estas diferencias se manifestaron más claramente en el CC que en el LC, pese a que los rendimientos fuesen mayores en el LC.

5. CONCLUSIONES

- La mayoría de los rizobios que nodulan alubia en las parcelas cultivadas de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León" pertenecen a la especie *Rhizobium leguminosarum*, especialmente en zonas donde la alubia ha sido un cultivo tradicional en las rotaciones. La especie *R. giardinii* también se aisló de los nódulos recogidos en una de las zonas donde el cultivo es menos tradicional.
- Todos los aislados pertenecen a la biovariedad phaseoli y presentaron dos alelos del gen *nodC*, implicado en el rango de hospedador de los rhizobia, típicos de las cepas de *Rhizobium etli* una especie endosimbionte de alubia de origen americano.
- La variabilidad fenotípica se correlacionó con la divergencia filogenética entre los aislados, ya que los aislados identificados como *Rhizobium giardinii* presentaron diferencias fenotípicas con respecto a los aislados del grupo próximo a *R. leguminosarum*. No obstante, se encontró también una elevada variabilidad interna en este último grupo. Aunque no se pudo establecer una correlación directa entre origen geográfico y perfil fenotípico, se observó que algunos aislados del mismo origen geográfico presentaron una mayor similitud fenotípica.
- El aislado LBM1210, identificado como *Rhizobium leguminosarum*, fue el único que presentó capacidad para solubilizar fosfato [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] *in vitro*, por lo que podría tener interés como inoculante para otro tipo de plantas además de la alubia.
- Existen diferencias de eficiencia de fijación de N_2 entre los aislados, destacando en medio hidropónico los aislados LCS0306, LEV0613, LPZ0913, ZBM1008 y LBM1123 (de las comarcas de la Cepeda, Valle del Esla, Páramo, Benavente y La Bañeza respectivamente). Cuando se cultivó alubia en suelos representativos de la IGP, los aislados LCS0306 y LBM1123 produjeron un rendimiento similar al obtenido abonando con nitrógeno (aporte equivalente a las extracciones de N del cultivo), lo que indica que estos aislados fueron capaces de satisfacer la demanda de N del cultivo. Por ello, resultan los más recomendables para desarrollar un inoculante.
- El suelo de Sueros de Cepeda (León) es más favorable para el cultivo de la alubia que el suelo de la ESTIA (León) en condiciones de campo, como resultado de una evaluación durante la misma campaña agrícola. Sin embargo, en condiciones de microcosmos, el rendimiento en semillas de alubia fue sensiblemente inferior en el suelo de Sueros de Cepeda.
- El laboreo convencional (con suelo desnudo) presenta los mejores rendimientos en el cultivo de la alubia en las condiciones ambientales del noroeste de Castilla y León. La siembra directa y los laboreos con una cubierta vegetal no son recomendables para el cultivo de la alubia para grano en esta región.

- La inoculación con rizobios seleccionados de la I.G.P. produce una respuesta positiva en el rendimiento del cultivo de alubia en sistemas de laboreo convencionales, algo que no se observa en un suelo bajo siembra directa.
- El aislado LBM1123 presenta los mejores resultados en los diferentes ambientes y años evaluados, por lo que será la cepa más recomendable para su empleo como inoculante, al presentar una mejor adaptación junto con la elevada eficiencia de fijación de N_2 .
- El cultivo de la alubia en el noroeste de Castilla y León presenta como principal limitación ambiental los veranos frescos, lo que puede modificar ciertos factores del desarrollo vegetal así como inhibir la correcta nodulación. Este factor es más limitante cuando existe una cobertura vegetal del suelo, ya que el efecto de éstas en la reducción de la temperatura de suelo no es favorable para el cultivo en el noroeste de Castilla y León, a diferencia de lo que ocurre en otras regiones, como las tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha desarrollado en el Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad de la Universidad de León (IMARENABIO - Laboratorios 2 y 9, invernadero y cámara de crecimiento), en la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria de la Universidad de León (ESTIA), (Laboratorio de Análisis Agrícola, Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y parcelas de experimentación), en Sueros de Cepeda (parcela de experimentación de José Álvarez Machado) y en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca (Laboratorio 209, Edificio Departamental de Biología).

Daniel Mulas García fue becario del Programa de Formación de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León (Orden EDU/1453/2005 de 28 de octubre, de la Consejería de Educación) y del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia de España (Resolución de 31 de agosto de 2006, de la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación).

La investigación fue posible gracias a los proyectos de investigación LE002B05 y LE025A07, financiados por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León.

El autor agradece a los directores la atención, profesionalidad y dedicación para que este documento se materialice. También agradece el apoyo prestado en la investigación al equipo investigador del Dr. Enrique Garzón Jimeno, al personal de la extinta Fundación Chicarro-Canseco-Banciella, al Área de Ingeniería Química del IMARENABIO, liderada por el Dr. Antonio Morán Palao, al grupo de investigación del Dr. Eustoquio Martínez Molina, de la Universidad de Salamanca, en especial a la Dra. Martha Helena Ramírez Bahena, a la Dra. Paula García Fraile y al Dr. Raúl Rivas González, a la Dra. Eliane Villamil Bangel (FEPAGRO, Porto Alegre, Brasil), a la Dra. Dulce Nombre Rodríguez Navarro (IFAPA, Alcalá del Río, Sevilla), al Dr. Daniel Blanco Cobián, a César Antonio Díaz Alcántara y a Pepe (Sueros de Cepeda, León). También colaboraron y merecen reconocimiento Vinicio Pérez Pérez, Sebastián López Llamazares y Óscar Rodríguez Martínez, (ESTIA), Ángel Alvaredo Álvarez, Sergio Hernández Ramírez, Jesús María Hernández Díez y Rosa María Bartolomé Honrado, y un agradecimiento para el personal de la ESTIA y del IMARENABIO, incluida Tina.

Daniel Mulas García realizó una estancia durante los estudios de tercer ciclo en 2008 en el *Center for Rhizobium Studies* de la *Murdoch University* (Perth, Australia) bajo la supervisión del Dr. Lambert Bräu, y le agradece la acogida y supervisión del trabajo así como a Rebecca G. Swift y Sharon Fox, y a todos los investigadores del centro, liderados por el Dr. Graham O'Hara y el Dr. John Howieson. También realizó una estancia durante 2009 en el *Instituto de*

Biociências de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) bajo la supervisión de la Dra. Luciane María Pereira Passaglia, a quien agradece su supervisión, así como a su equipo de investigación, la Dra. Anelise Beneduzi y la Dra. Samanta Bolzán Campos.

A mi familia: padres, hermana, abuelos y primas

A Alison Cristina Gurini

A Farouk Darwiche Criado

A mis amigos

A mi pueblo, Morales del Vino

A Zamora

A León

A la cafetería de Agricultoras

A San Isidro

A la cerveza

6. REFERENCIAS

- AARONS SR, GRAHAM PH. 1991. *Response of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli to acidity*. Plant and Soil. p. 145-151.
- ABRIL A, ZURDO-PIÑEIRO JL, PEIX A, RIVAS R, VELÁZQUEZ E. 2007. *Solubilization of phosphate by a strain of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii isolated from Phaseolus vulgaris in El Chaco Árido soil (Argentina)* En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. Dordrecht, Holanda
- ADL SM, COLEMAN DC, READ F. 2006. *Slow recovery of soil biodiversity in sandy loam soils of Georgia after 25 years of no-tillage management*. Agriculture, Ecosystems and Environment. 114, 2-4. p. 323-334.
- AGUILAR OM, LOPEZ V, RICCILLO PM, GONZALEZ RA, PAGANO M, GRASSO DH, PUHLER A, FAVELUKES G. 1998. *Prevalence of the Rhizobium etli-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina*. Applied and Environmental Microbiology. 64. p. 3520-3524.
- AGUILAR OM, RIVA O, PELTZER E. 2004. *Analysis of Rhizobium etli and of its symbiosis with wild Phaseolus vulgaris supports coevolution in centers of host diversification*. Proceedings of the Natural Academy of Science of the USA. 101. p. 13548-13553.
- ALBAREDA M, RODRÍGUEZ NAVARRO DN, CAMACHO M, TEMPRANO FJ. 2008. *Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations*. Soil Biology and Biochemistry. 40. p. 2771-2779.
- ALBERTON O, KASCHUK G, HUNGRIA M. 2006. *Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean*. Soil Biology & Biochemistry. 38. p. 1298-1307.
- ALLEN ON, ALLEN EK. 1981. *The Leguminosae*. Macmillan Publishers Ltd. Londres, Reino Unido.
- ALLEN MB, ARNON DI. 1955. *Studies on nitrogen-fixing blue-green Algae. I. Growth and nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm*. Plant Physiology. 30. p. 366-372.
- ÁLVAREZ MARTÍNEZ ER. 2007. *Coevolución de plantas leguminosas herbáceas de la provincia corológica Mediterránea Ibérica Occidental y de sus endosimbiontes bacterianos*. En Microbiología y Genética. Salamanca: Universidad de Salamanca. España.
- ALVAREZ-MARTÍNEZ ER, VALVERDE A, RAMÍREZ-BAHENA MH, GARCÍA-FRAILE P, TEJEDOR C, MATEOS PF, SANTILLANA N, ZÚÑIGA D, PEIX A, 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*. Archives of Microbiology. 191. p. 659-668.
- AMARGER N, MACHERET V, LAGUERRE G. 1997. *Rhizobium gallicum sp. nov. and Rhizobium giardinii sp. nov., from Phaseolus vulgaris nodules*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 47. p.996-1006.
- AMARGER N. 2001. *Rhizobia in the field*. En: Advances in Agronomy. Academic Press. Londres, Reino Unido.
- ARREDONDO-PETER R, ESCAMILLA E. 1993. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein banding patterns Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli strains isolated from the mexican bean Phaseolus coccineus*. Applied and Environmental Microbiology. 59. p. 3960-3962.

- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES DE INOCULANTES. 2010. En: <<http://www.anpii.org.br/>>. Revisado el 8 de abril de 2010.
- BARRY T, GLENNON CM, DUNICAN LK, GANNON F. 1991. *The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria*. PCR Methods Application. 1. p. 149.
- BASHAN Y. 1998. *Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture*. Biotechnology Advances. 16, 4. p. 729-770.
- BATISH DR, LAVANYA K, SINGH HP, KOHLI RK. 2007. *Phenolic allelochemicals released by Chenopodium murale affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea*. Plant Growth Regulation. 51. p.119-128.
- BECK DP, MATERON LA, AFANDI F. 1993. *Practical Rhizobium-Legume technology manual. Technical Manual No. 19*. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria
- BENEDEZI A, PERES D, VARGAS LK, BODANESE-ZANETTINI MH, PASSAGLIA LMP. 2008. *Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil*. Applied Soil Ecology. 39, 3. p. 311-320.
- BHARDWAJ KKR. 1975. *Survival and symbiotic characteristics of Rhizobium in saline-alkaline soils*. Plant and Soil. 134. p. 145-151.
- BROCKMAN FJ, BEZDICEK DF. 1989. *Diversity within serogroups of Rhizobium leguminosarum biovar viciae in the Palouse region of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance and topography*. Applied and Environmental Microbiology. 55. p. 109-115.
- BROCKWELL J, BOTTOMLEY PJ. 1995. *Recent advances in inoculant technology and prospects for the future*. Soil Biology and Biochemistry. 21. 415. 683-697
- BROUGHTON WJ, PERRET X. 1999. *Genealogy of legume-Rhizobium symbioses*. Current Opinion in Plant Biology. 2. p. 305-311.
- BULLARD GK, ROUGHLEY RJ, PULSFORD DJ. 2005. *The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953–2003*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 45. p. 127-140.
- BUTTERY BR, PARK SJ, FINDLAY WJ. 1987. *Growth and yield of white bean (Phaseolus vulgaris L.) in response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer and to inoculation with Rhizobium*. Canadian Journal of Plant Science 67. p. 425-432.
- BUTTERY BR, PARK SJ, VAN BERKUM P. 1997. *Effects of common bean (Phaseolus vulgaris L.) cultivar and rhizobium strain on plant growth, seed yield and nitrogen content*. Canadian Journal of Plant Science. p.347-351.
- CABALLERO-MELLADO J, MARTINEZ-ROMERO E. 1999. *Soil fertilization limits the genetic diversity of Rhizobium in bean nodules*. Symbiosis. 26. p. 111-121.
- CAMPELO MP, LORENZANA A, MARCOS MF, AMEZ M, BOTO JA, CASQUERO PA. 2007. *Eficacia en campo de dos fungicidas para el control del "mal de pie" de la judía (Phaseolus vulgaris L.) en La Bañeza (León)*. Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas. 33. p.297-308.
- CAMPO RJ, ARAUJO RS, HUNGRIA M. 2009. *Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil*. Field Crops Research. 110. p. 219–224
- CANWEST MEDIAWORKS PUBLICATIONS. 2007. Philom Bios sale positive: owner. En:
<<http://www.canada.com/saskatoonstarphoenix/news/business/story.html?id=df86c419-bebb-46f2-8706-01787999c3ee>>.
Revisado el 08/04/2010

- CASQUERO PA, LEMA M, SANTALLA M, DE RON AM. 2006. *Performance of common bean (Phaseolus vulgaris L.) landraces from Spain. Genetic Resources and Crop Evolution*. 53. p.1021–1032.
- CASTROVEJO S, TALAVERA S, AEDO C, ROMERO ZARCO C, SAEZ L, SALGUEIRO FJ, VELAYOS M (eds). 1986. *Flora-Península Ibérica. Tomo VII: Leguminosae*. Real Jardín Botánico - CSIC. Madrid, España.
- CATROUX G, HARTMANN A, REVELLIN C. 2001. *Trends in rhizobial inoculant production and use*. Plant and Soil. 230. p. 21-30.
- CHABOT R, ANTOUN H, CESCAS MP. 1996. *Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. Plant and Soil 184. p. 311-321.
- CHRISTENSEN H, OLSEN JE. 1998. *Phylogenetic relationships of Salmonella based on DNA sequence comparison of atpD encoding the beta subunit of ATP synthase*. FEMS Microbiology Letters. 161. p. 89-96.
- CHUN J. 2001. PHYDIT version 3.1. Disponible en <<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>>.
- COLE MA, ELKAN GH. 1979. *Multiple antibiotic resistant in Rhizobium japonicum*. Applied and Environmental Microbiology. 37. p. 867-870.
- COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2001. *Directiva 2001/36/CE de la Comisión, de 16 de mayo de 2001 por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas num. L 164 de 20/06/2001. p. 0001-0038
- CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA. 2009. *Boletín de Información Agraria de Castilla y León 09/2009*. Junta de Castilla y León. Valladolid, España
- CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 1991. *Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 230 de 19/08/1991. p. 0001-0032.
- COX RM, FAY P, FOGG GE. 1964. *Nitrogen fixation and photosynthesis in a subcellular fraction of the blue-green alga Anabaena cylindrica*. Biochimica et Biophysica Acta. 88. p. 208-210.
- DALAL RC, STRONG WM, DOUGHTON JA, WESTON EJ, McNAMARA GT, COOPER JE. 1997. *Sustaining productivity of a Vertisol at Warra, Queensland, with fertilizers, no-tillage or legumes. 4. Nitrogen fixation, water use and yield of chickpea*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 37. p. 667-676.
- DARDANELLI MS, FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA FJ, ESPUNY MR, RODRÍGUEZ CARVAJAL MA, SORIA DÍAZ ME, GIL SERRANO AM, OKON Y, MEGÍAS M. 2008. *Effect of Azospirillum brasilense coinoculated with Rhizobium on Phaseolus vulgaris flavonoids and Nod factor production under salt stress*. Soil Biology and Biochemistry. 40. p. 2713-2721.
- DATE RA, HURSE LS. 1991. *Intrinsic antibiotic resistance and serological characterization of populations of indigenous Bradyrhizobium isolated from nodules of Desmodium intortum and Macroptilium atropurpureum in 3 soils of SE Queensland*. Soil Biology and Biochemistry. 23. p. 551-561.
- DATE RA. 2001. *Advances in inoculant technology: A brief review*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 41. p. 321-325.
- DAZA A, SANTAMARÍA C, RODRÍGUEZ-NAVARRO DN, CAMACHO M, ORIVE R, TEMPRANO F. 2000. *Perlite as carrier for bacterial inoculants*.

- DE FELIPE M R. 2006. *Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre*. En Bedmar E, Gonzalo J, Lluch C, Rodelas B (eds). *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*, p. 9-16. Sociedad Española de Microbiología (SEFIN). Granada, España
- DE LAJUDIE P, WILLEMS A, POT B, DEWETTINCK D, MAESTROJUAN G, NEYRA M, COLLINS MD, DREYFUS B, KERSTERS K, 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.* International Journal of Systematic Bacteriology. 44. p. 715-733.
- DENTON MD, PEARCE DJ, BALLARD RA, HANNAH MC, MUTCH LA, NORNG S, SLATTERY JF. 2009. *A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation*. Soil Biology and Biochemistry. 41, 12. p. 2508-2516.
- DERPSCH R, FRIEDRICH T. 2009. *Global overview of Conservation Agriculture No-till adoption*. En: 4th World Congress on Conservation Agriculture New Delhi, India. (libro de actas del congreso).
- DI CELLO F, BEVIVINO A, CHIARINI L, FANI R, PAFFETTI D, TABACCHIONI S, DALMASTRI C. 1997. *Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages*. Applied and Environmental Microbiology. 63. p. 4485-4493.
- DOBEREINER J. 1961. *Nitrogen-fixing bacteria of the genus Beijerinckia Derx in the rhizosphere of sugar cane*. Plant and Soil 15. p. 211-216
- DOBERT RC, BREIL BT, TRIPLETT EW. 1994. *DNA sequence of the common nodulation genes of Bradyrhizobium elkanii and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria*. Molecular Plant Microbe Interactions. 7. p. 564-572.
- DOWDLE SF, BEN BOHLOOL B. 1986. *Predominance of fast-growing Rhizobium japonicum in a soybean field in the People's Republic of China*. Applied and Environmental Microbiology. 50. p. 1171-1176.
- EISEN JA. 1995. *The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species*. Journal of Molecular Evolution. 41. p. 1105-1123.
- ELBELTAGY A, NISHIOKA K, SATO T, SUZUKI H, YE B, HAMADA T, ISAWA T, MITSUI H, MINAMISAWA K. 2001. *Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species*. Applied and Environmental Microbiology. 67. p. 5285-5293.
- ELIDRISSI MM, AUJJAR N, BELABED A, DESSAUX Y, FILALIMALTOUF A. 1996. *Characterization of rhizobia isolated from carob tree (Ceratonia siliqua)*. Journal of Applied Bacteriology. 80. p. 165-173.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. 2009. En:
< <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2009/agosto/1a-semana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo>>. Revisado el 22 de abril de 2010.
- ESPAÑA. 2002. *Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal*. Boletín Oficial del Estado núm. 279 de jueves 21 de noviembre de 2002. p. 40970-40988.
- ESPAÑA. 2005. *Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes*. Boletín Oficial del Estado núm. 171 de martes 19 de julio de 2005. p. 25592-25669.

- ESPAÑA. 2006. ORDEN APA/289/2006, de 27 de enero, por la que se ratifica el Reglamento de la indicación geográfica protegida «Alubia de La Bañeza-León». Boletín Oficial del Estado núm. 35 de viernes 16 de febrero de 2006. p.5347-5354.
- ESPAÑA. 2008a. Real Decreto 1769/2007 de 28 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado núm. 14 de miércoles 16 enero 2008. p. 3140-3141.
- ESPAÑA. 2008b. Orden APA/863/2008 de de 25 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II, III, y VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado núm. 79 de martes 1 de abril de 2008. p. 18141-18180.
- EUROPEAN CONSERVATION AGRICULTURE FOUNDATION, 2010. En: <<http://www.ecaf.org/>>. Revisado el 9 de abril de 2010.
- FAOSTAT, 2010. En: <<http://faostat.fao.org/>>. Revisado el 9 de marzo de 2010.
- FARRAND SK, VAN BERKUM PB, OGER P. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53. p.1681–1687.
- FERRERIRA MC, ANDRADE DS, CHUEIRE LMO, TAKEMURA SM, HUNGRIA M. 2000. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. Soil Biology and Biochemistry. 32. p. 627-637.
- FETTELL NA, O'CONNOR GE, CARPENTER DJ, EVANS J, BAMFORTH I, OTI-BOATENG C, HEBB DM, BROCKWELL J. 1997. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: the influence of soil populations and inocula of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* on nodulation and nitrogen fixation by field peas. Applied Soil Ecology. 5, 3. p. 197-210.
- FILEK W, KOSCIELNIAK J, GRZESIAK S. 1997. The effect of nitrogen fertilization and population density of the field bean (*Vicia faba* L. minor) of indeterminate and determinate growth habit on the symbiosis with root nodule bacteria and on the seed yield. Journal of Agronomy and Crop Science. 179. p.171-177
- FRANCIS CA, PRAGER M, TEJADA G. 1982. Density interactions in tropical intercropping maize (*Zea mais* L.) and climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Field Crops Research. 5. p.163-176.
- FRANK B (1889) Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Bet. Dtsch. Bot. Ges. 7:332-346
- FRED EB, BALDWIN IL, MCCOY E. 1932. *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. University of Wisconsin Press, Madison. EE.UU.
- GARCÍA FRAILE P. 2008. *Identificación y caracterización de bacterias que nodulan Phaseolus en diferentes regiones de España* (Tesis Doctoral). Directores: Velázquez E, Rivas R. Universidad de Salamanca, Departamento de Microbiología y Genética. Salamanca, España.
- GARCIA-FRAILE P, MULAS-GARCÍA D, PEIX A, RIVAS R, GONZÁLEZ ANDRÉS F, 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. Canadian Journal of Microbiology. En Prensa.
- GAUNT MW, TURNER SL, RIGOTTIER-GOIS L, LLOYD-MACGILP SA, YOUNG JPW. 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51. p. 2037-2058.

- GEPTS P, DEBOUCK D. 1991. *Origin, domestication, and evolution of the common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. En: van Schoonhoven A, Voysest O. (eds). *Common Beans: Research for Crop Improvement*. CAB, Wallingford, Reino Unido - Cali, Colombia, p 7–53.
- GIONGO A, PASSAGLIA LMP, FREIRE JRJ, SÁ ELS. 2007. *Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of Phaseolus vulgaris L. in Brazil*. *Biology and Fertility of Soils*. 43. p. 593-598.
- GLYNN P, HIGGINS P, SQUARTINI A, O'GARA F. 1985. *Strain identification in Rhizobium trifolii using DNA restriction analysis, plasmid DNA profiles and intrinsic antibiotic resistances*. *FEMS Microbiology Letters*. 30. p. 177-182.
- GONZÁLEZ TO, CAPANHARO JC, LEMOS EGM. 2008. *Genetic characterization and nitrogen fixation capacity of Rhizobium strains on common bean*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43, 9. p. 1177-1184.
- GRAHAM PH, DRAEGER KJ, FERREY ML, CONROY MJ, HAMMER BE, MARTÍNEZ E, AARONS SR, 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*. *Canadian Journal of Microbiology*. 40. p. 198-207.
- GRAHAM PH, Parker CA. 1964. *Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes*. *Plant and Soil*. 20. p. 383-386.
- GRAHAM PH, Parker CA. 1964. *Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes*. *Plant and Soil*. 20. p. 383-386.
- GRAHAM PH, RANILLI P. 1997. *Common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *Field Crops Research* 53. p. 131-146.
- GRAHAM PH, VANCE CP. 2003. *Legumes: importance and constraints to greater use*. *Plant Physiology*. 131. p. 872-877.
- GRAHAM PH, VANCE PV. 2000. *Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs*. *Field Crops Research*. 65, 2-3. p. 93-106.
- GRAHAM PH, VITTERI SE, MACKIE F, VARGAS AT, PALACIOS A. 1982. *Variations in acid soil tolerance among strains of Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research*. 5. p. 121-128.
- GRAHAM PH. 1963. *Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria of legumes*. *Australian Journal of Biological Sciences*. 16. p. 557-559.
- GRAHAM PH. 1981. *Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris L.: A review*. *Field Crops Research*. 4. p. 93–112.
- GRANGE L, HUNGRIA M, GRAHAM PH, MARTÍNEZ-ROMERO E. 2007. *New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (Phaseolus vulgaris) in Brazil*. *Soil Biology & Biochemistry*. 39. p. 867–876.
- GRANGE L, HUNGRIA M. 2004. *Genetic diversity of indigenous common bean (Phaseolus vulgaris) rhizobia in two Brazilian ecosystems*. *Soil Biology and Biochemistry*. 36. p. 1389-1398.
- HAGEDORN C. 1979. *Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in Rhizobium trifolii populations*. *Soil Science Society of America Journal*. 43. p. 921-925.
- HAGER T, 2008. *The Alchemy of Air*. Harmony Books. Nueva York, EE.UU.

- HARTEL PG, ALEXANDER M. 1983. *Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils*. Soil Science Society of America Journal. 44. p. 502-506.
- HARTEL PG, ALEXANDER M. 1984. *Temperature and desiccation tolerance of cowpea Vigna unguiculata rhizobia*. Canadian Journal of Microbiology..
- HARTMANN A, AMARGER N. 1991. *Genotypic diversity of an indigenous Rhizobium meliloti field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing*. Canadian Journal of Microbiology. 37. p. 600-608.
- HERRERA-CERVERA JA, CABALLERO-MELLADO J, LAGUERRE G, TICHY HV, REQUENA N, AMAGER N, MARTÍNEZ-ROMERO E, OLIVARES J, SANJUÁN J. 1999. *At least five rhizobial species nodulate Phaseolus vulgaris in a Spanish soil*. FEMS Microbiol Ecology. 30. p. 87-97.
- HERRIDGE DF. 2005. *Inoculation technology for legumes*. En: Dilworth MJ, James EK; Sprent JI, Newton, WE (eds). Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Springer, Dordrecht, Holanda.
- HEYNDRIX M, VAUTERIN L, VANDAMME P, KERSTERS K, DE VOS P. 1996. *Applicability of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy*. Journal of Microbiology Methods. 8. p. 232-248.
- HIRSCH PR. 1996. *Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field*. New Phytologist. 133, 1. p. 159-171
- HOWIESON J, BALLARD R. 2004. *Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia—some contemporary thoughts*. Soil Biology and Biochemistry. 36, 8. p. 1261-1273.
- HOWIESON J, MALDEN J, YATES RJ, O'HARA GW. 2000. *Techniques for the selection and development of elite inoculant strains of Rhizobium leguminosarum in Southern Australia*. Symbiosis. 28. p. 33-48.
- HUGHES RM, HERRIDGE DF. 1989. *Effect of tillage on yield, nodulation and nitrogen fixation of soybean in far north-coastal New South Wales*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 29. p. 671-677.
- HULTON CSJ, HIGGINS CP, SHARP PM. 1991. *ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria*. Molecular Microbiology. 5. p. 825-834.
- HUNGRIA M, ANDRADE DS, CHUEIRE LM DE O, PROBENZA A, GUTTIERREZ-MAÑERO FJ, MEGÍAS M. 2000. *Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobia from Brazil*. Soil Biology and Biochemistry. 32. p. 1515-1528.
- HUNGRIA M, CAMPO RJ, MENDES IC. 2003. *Benefits of inoculation of the common bean (Phaseolus vulgaris) crop with efficient and competitive Rhizobium tropici strains*. Biology and Fertility of Soils. 39. p.88-93.
- HUNGRIA M, LOUREIRO MF, MENDES IC, CAMPO RJ, GRAHAM PH. 2005. *Inoculant preparation, production and application*. En: Werner D, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, Springer, Dordrecht, Holanda
- HUNGRIA M, VARGAS MAT, ARAUJO RS. 1997. *Fixacao biologica do nitrogenio em feijoeiro*. In: Vargas MAT, Hungria M (eds) Biologia dos Solos dos Cerrados. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brasil, p. 189–294.
- HUNGRIA M, VARGAS MAT. 2000. *Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on*

- Brazil. *Field Crops Research*. 65. p. 151-164.
- IBÁÑEZ F, TAURIAN T, ANGELINI J, TONELLI ML, FABRA A. 2008. *Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts Rhizobium giardinii and Rhizobium tropici isolated from peanut nodules in Central Argentina*. *Soil Biology and Biochemistry*. 40. p. 537–539.
- IGLESIAS O, RIVAS R, GARCÍA-FRAILE P, ABRIL A, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E, VELÁZQUEZ E. 2007. *Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate Prosopis alba in North Spain*. *FEMS Microbiology Letters*. 277. p. 210-216.
- IGUAL JM, VALVERDE A, RIVAS R, MATEOS PF, RODRÍGUEZ-BARRUECO C, MARTÍNEZ-MOLINA E, CERVANTES E, VELÁZQUEZ E. 2003. *Genomic fingerprinting of Frankia strains by PCR-based techniques. Assessment of a primer based on the sequence of 16S rRNA gene of Escherichia coli*. *Plant and Soil*. 254. p. 115-123.
- ILDIS. 2007. *The Family Leguminosae. International Legume Database and Information Service website*. <http://www.ildis.org/Leguminosae>. Revisado el 8 de abril de 2008
- INE. 2010. En <<http://www.ine.es/>>. Revisado el 30 de marzo de 2010.
- INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION. 2010. *World Fertilizer Consumption*. IFA, Paris. En: <<http://www.fertilizer.org/ifa/statistics/>> Revisado el 6 de abril de 2010.
- ITACYL, 2010. En: <http://www.itacyl.es/opencms_wf/trabajo/figurasCalidad/inicio.html>. Revisado el 7 de abril de 2010.
- JEANMOUGIN F, THOMPSON JD, GOUY M, HIGGINS DG, GIBSON JD. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23. p. 403–405
- JENKINS MB, BOTTOMLEY PJ. 1985. *Composition and field distribution of the population of Rhizobium meliloti in root nodules of uninoculated field-grown alfalfa*. *Soil Biology and Biochemistry*. 17. p. 173-179.
- KAMI J, BECERRA-VELASQUEZ V, DEBOUCK DG, GEPTS P. 1995. *Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in Phaseolus vulgaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 1101–1104.
- KASCHUK G, HUNGRIA M, ANDRADE DS, CAMPO RJ. 2006. *Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (Phaseolus vulgaris L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil*. *Applied Soil Ecology*. 32. p. 210-220.
- KESSEL C, HARTLEY C. 2000. *Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?*. *Field Crops Research*. 65, 2-3. p. 165-181.
- KIM SE, OKUBO H. 1995. *Control of growth habit in determinate lablab bean (Lablab purpureus) by temperature and photoperiod*. *Scientia Horticulturae*. 61. p.147-155.
- KIMURA M. 1980. *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111-120
- KINGSLEY MT, BEN BOHLOOL B. 1983. *Characterization of Rhizobium sp. (Cicer arietinum L.) by immunofluorescence, immunodiffusion, and intrinsic antibiotic resistance*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29. p. 518-526.
- KNAVEL DE, HERRON JW. 1986. *Response of vegetable crops to nitrogen rates in tillage systems with and without vetch and ryegrass*. *American Society for Horticultural Sciences Journal*. 111, 2. p. 502-507.

- KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN IB, NEI M. 2001. MEGA2: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*. Arizona State University. Tempe. EE.UU..
- KUYKENDALL LD. 2005. *Family I. Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Stanley JT (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, C. p. 324-361. Springer, Nueva York, EE.UU.
- KWON S, PARK SY, KIM JS, KANG JW, CHO YH, LIM CK, PARKER MA, LEE GB. 2005. *Phylogenetic analysis of the genera Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium and Sinorhizobium on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, p. 263–270
- LAGUERRE G, MAVINGUI P, ALLARD MR, CHARNAY MP, LOUVRIER P, MAZURIER SI, RIGOTTIER-GOIS L, 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*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62. p. 2029-2036.
- LAGUERRE G, NOUR SM, MACHERET V, SANJUAN J, DROUIN P, 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
- LEBUHN, M., BATHE, S., ACHOUAK, W., HARTMANN, A., HEULIN, T. Y SCHLOTTER, M. 2006. *Comparative sequence analysis of the internal transcribed spacer 1 of Ochrobactrum species*. *Systematic and Applied Microbiology*. 29. p. 265-275.
- LI Y, PARSONS R, DAY DA, BERGENSEN FJ. 2002. *Reassessment of major products of N₂ fixation by bacteroids from soybean root nodules*. *Microbiology*. 148. p. 1959–1966.
- LIE TA, MUILENBURG M, HIEP NH, AYHAN K. 1992. *Cultivation of Bradyrhizobium CB756 on sucrose pre-fermented by yeast*. *Canadian Journal of Microbiology*. 38. p. 569-572.
- LIIV A, TENSON T, MARGUS T, REMME J. 1998. *Multiple functions of the transcribed spacers in ribosomal RNA operons*. *Biological Chemistry*. 379. p. 783-793.
- LLOYD AT, SHARP PM. 1993. *Evolution of the recA gene and the molecular phylogeny of bacteria*. *Journal of Molecular Evolution*. 37. p. 399-407.
- LÓPEZ-BELLIDO L, LÓPEZ-BELLIDO RJ, REDONDO R, BENÍTEZ J. 2006. *Faba bean nitrogen fixation in a wheat-based rotation under rainfed Mediterranean conditions: Effect of tillage system*. *Field Crops Research*. 98. p.253-260.
- LÓPEZ-BELLIDO RJ, LÓPEZ-BELLIDO L, CASTILLO JE, LÓPEZ-BELLIDO FJ. 2004. *Chickpea response to tillage and soil residual nitrogen in a continuous rotation with wheat. II. Soil nitrate, N uptake and influence on wheat yield*. *Field Crops Research*. 88, 2-3. p. 201-210.
- LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AH, RANDAL RJ. 1951. *Protein measurement with Folin phenol reagent*. *Journal of Biology and Chemistry*. 193. p. 265-275.
- LOWTHER WL, PATRICK HN. 1995. *Rhizobium strain requirements for improved nodulation of Lotus corniculatus*. *Soil Biology and Biochemistry*. 27. p.721-724.
- LUPWAYI NZ, OLSEN PE, SANDE ES, KEYSER HH, COLLINS MM, SINGLETON PW, RICE WA. 2000. *Inoculant quality and its evaluation*. *Field Crops Research*. 65. p. 259-270.

- MACDONALD RM. 1989. *An overview of crop inoculation*. En: Campbell R, Macdonald RM (eds) *Microbial inoculation of crop plants*. p. 1-9, Special publication of the society of general microbiology, vol. 25. IRL Press, Oxford, Nueva York, EE.UU.
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2003. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Pearson-Alhambra. Madrid, España.
- MAPA. 2008. *Anuario estadístico 2008*. En:
<<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp?parte=3&capitulo=20&grupo=2&seccion=2>>. Revisado el
- MARECHAL J, CLEMENT B, NALIN R, GANDON C, ORSO S, CVEJIC JH, BRUNETEAU M, BERRY A, NORMAND P. 2000. *A recA gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of Frankia to Acidothermus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50. p. 781-785.
- MARTENS M, DELAERE M, COOPMAN R, DE VOS P, GILLIS M, WILLEMS A. 2007. *Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57.p. 489-503.
- MARTÍNEZ-ROMERO E, SEGOVIA L, MERCANTE FM, FRANCO AA, GRAHAM P, PARDO MA. 1991. *Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp. trees*. *International Journal of Systematic Bacteriology* .41. p. 417-426.
- MARTÍNEZ-ROMERO E. 2003. *Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: overview and perspectives*. *Plant and Soil*. 252, 1 . p.11-23.
- MATEOS PF, BAKER DL, PETERSEN M, VELÁZQUEZ E, JIMÉNEZ-ZURDO JI, MARTÍNEZ-MOLINA E, SQUARTINI A, ORGAMBIDE D, HUBBELL DH, DAZZO FB. 2001. *Erosion of root epidermal cell walls by Rhizobium polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the Rhizobium-legume symbiosis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47. p. 475-487.
- MCINNIS A, HOLFORD P, THIES JE. 2005. *Characterisation of dry and mucoid colonies isolated from Australian rhizobial inoculant strains for Medicago species*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 45. p. 151-159.
- MENDEZ-CASTRO FA, ALEXANDER M. 1976. *Acclimatation of rhizobia to salts, increasing temperature and acidity*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 18. p. 155-158.
- MERCK. 2006a. *Nitragin acquires Agribiotics Inc. to expand plant health technology portfolio*. En:
<http://www.nitragin.com/company/news.cfm?ARTICLE_TYPE_ID=1>. Revisado el 8 de abril de 2010.
- MERCK. 2006b. *Nitragin Becomes EMD Crop BioScience*. En:
<http://www.nitragin.com/company/news.cfm?ARTICLE_TYPE_ID=1>. Revisado el 8 de abril de 2010.
- MEYER MC, PUEPPKE SG. 1980. *Differentiation of Rhizobium japonicum strain derivatives by antibiotic sensitivity patterns, lectin binding and utilization of biochemicals*. *Canadian Journal of Microbiology*. 26. p. 606-612.
- MICHIELS J, DOMBRECHT B, VERMEIREN N, XI C, LUYTEN E, VANDERLEYDEN J. 1998. *Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation*. *FEMS Microbiology Ecology*. 26. p. 193-205.
- MICHIELS J, VERRETH C, VANDERLEYDEN J. 1994. *Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60. p. 1206-1212.

- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, RURAL Y MARINO. 2010a. *Registro de Productos Fertilizantes*. En: <
<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp#art1>> Revisado el 7 de abril de 2010.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, RURAL Y MARINO. 2010b. *Registro de Organismos de Control Biológico*. En: <
<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroOCB.pdf>>. Revisado el 9 de abril de 2010.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, RURAL Y MARINO. 2010c. *Registro de Otros Medios de Defensa Fitosanitaria*. En: <
<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroODMF.pdf>>. Revisado el 9 de abril de 2010.
- MIRANDA ESCOLAR B, RICO GONZÁLEZ B. 2007. *La agricultura de Castilla y León: situación actual y retos de futuro*. En: Gómez-Limón JA (coord). *El futuro de la agricultura en Castilla y León*. ITAGRA-CT. Palencia, España
- MNASRI B, MRABET M, LAGUERRE G, AOUANI ME, MHAMDI R. 2007. *Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with Phaseolus vulgaris constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of Sinorhizobium meliloti*. Archives of Microbiology. 187. p. 79-85.
- MOSTASSO L, MOSTASSO FL, DIAS BG, VARGAS MAT, HUNGRIA M. 2002. *Selection of bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados*. Field Crops Research. 73. p. 121-132.
- MPEPEREKI S, MAKONESE F, WOLLUM AG. 1997. *Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating Vigna unguiculata in Zimbabwean soils*. Symbiosis. 22. p. 275-292.
- MUELLER JG, SKIPPER HD, SHIPE ER, GRIMES L, WAGNER SC. 1988. *Intrinsic antibiotic resistance in Bradyrhizobium japonicum*. Soil Biology and Biochemistry. 20. p. 879-882.
- MUNEVAR F, WOLLUM AG. 1981. *Growth of Rhizobium japonicum strains at temperatures above 27°C*. Applied and Environmental Microbiology. 42. p. 272-276.
- MUYZER G. 1999. *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology. 20 p.323-327.
- NLEYA T, WALLEY FL, VANDENBERG F. 2009. *Response of determinate and indeterminate common bean genotypes to Rhizobium inoculant in a short season rainfed production system in the Canadian prairie*. Journal of Plant Nutrition. 32. p. 44-57.
- NOBBE F, HILTNER L. 1896. US Patent 570 813. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.
- OKON Y, LABANDERA-GONZALEZ CA. 1994. *Agronomic applications of Azospirillum - an evaluation of 20 years worldwide field inoculation*. Soil Biology and Biochemistry. 26. p. 1591-1601.
- ORMEÑO E, TORRES R, MAYO J, RIVAS R, PEIX A, VELÁZQUEZ E, ZUÑIGA D. 2007. *Phaseolus lunatus is nodulated by a phosphate solubilizing strain of Sinorhizobium meliloti in a Peruvian soil*. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer. Dordrecht, Holanda.
- ORMENO-ORRILLO E, VINUESA P, ZUNIGA-DAVILA D, MARTINEZ-ROMERO E. 2006. *Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (Phaseolus lunatus L.) in Peru*. Systematic and Applied Microbiology. 29, 3. p. 253-262
- OSBORN AM, MOORE ERB, TIMMIS KN. 2000. *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics*. Environmental Microbiology. 2. p. 39-50.

- PARKER MA. 2002. *Bradyrhizobia* from wild Phaseolus, Desmodium, and Macroptilium species in Northern Mexico. Applied and Environmental Microbiology, 68 (4), 2044-2048
- PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO. 2009. *Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 309 de 24/11/2009. p. 71-87.
- PAYNE GW, VANDAMME P, MORGAN SH, LIPUMA JJ, COENYE T, WEIGHTMAN AJ, JONES TH, MAHENTHIRALINGAM E. 2005. *Development of a recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus*. Applied and Environmental Microbiology. 71. p. 3917-3927.
- PEIX A, MATEOS PF, RODRÍGUEZ-BARRUECO C, MARTÍNEZ MOLINA E, VELÁZQUEZ E. 2001b. *Growth promotion of common bean (Phaseolus vulgaris L.) by a strain of Burkholderia cepacia under growth chamber conditions*. Soil Biology and Biochemistry. 32. p. 1927-1935.
- PEIX A, RIVAS-BOYERO A, MATEOS PF, RODRÍGUEZ-BARRUECO C, MARTÍNEZ-MOLINA E, VELÁZQUEZ E. 2001a. *Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of Mesorhizobium mediterraneum under growth chamber conditions*. Soil Biology & Biochemistry. 33. p. 103-110.
- PEIX A, VELÁZQUEZ E, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2007. *Molecular methods for biodiversity analysis of phosphate solubilizing microorganisms (PSM)*. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. Dordrecht, Holanda
- PEOPLES MB. 2008. *The role of biological N fixation in cropping systems and its environmental impact*. En: 8th European N Fixation Conference. Gent, Belgium. (libro de actas del congreso)
- PERRET X, STAEHELIN C, BROUGHTON WJ. 2000. *Molecular basis of symbiotic promiscuity*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64. p. 180-201.
- PETERSEN DJ, SRINIVASAN M, CHANWAY CP. 1996. *Bacillus polymyxa stimulates increased Rhizobium etli populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of Phaseolus vulgaris*. FEMS Microbiology Letters. 142, 2-3. p. 271-276.
- PETERSEN KD, CHRISTENSEN H, BISGAARD M, OLSEN JE. 2001. *Genetic diversity of Pasteurella multocida fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial atpD sequence comparisons*. Microbiology. 147. p. 2739-2748.
- PHILLIPS PWB. 2004. *An economic assessment of the global inoculant industry*. En: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/inoculant/>>. Revisado el 5 de abril de 2010.
- POUSTINI K, MABOOD F, SMITH DL. 2005. *Low root zone temperature effects on bean (Phaseolus vulgaris L.) plants inoculated with Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli pre-incubated with methyl jasmonate and/or genistein*. Acta Agriculturae Scandinavica (Section B-Soil and Plant Science). 55. p. 293-298.
- PRELL J, POOLE P. 2006. *Metabolic changes of rhizobia in legume nodules*. Trends in Microbiology. 14, 4. p. 161-168.
- PRIEFER UB, AURAG J, BOESTEN B, BOUHMOUCH I, DEFEZ R, FILALI-MALTOUF A, MIKLIS M, MOAWAD H, MOUHSINE B, PRELL A, SCHLUTER A, SENATORE B. 2001. *Characterization of Phaseolus symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance*. Journal of Biotechnology. 91. p.223-236.
- Ramírez ME, Israel DW, Wollum AG. 1997. *Phenotypic and genotypic diversity of similar serotypes of soybean bradyrhizobia from*

- two soil populations. *Soil Biology and Biochemistry*. 29. p. 1539-1545.
- RAMÍREZ-BAHENA MH, GARCÍA-FRAILE P, PEIX A, VALVERDE A, RIVAS R, IGUAL JM, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E, 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.*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58. p.2484-2490.
- RAMÍREZ-BAHENA MH, VELÁZQUEZ E, FERNÁNDEZ-SANTOS F, PEIX A, MARTÍNEZ-MOLINA E, MATEOS PF. 2009. *Phenotypic, genotypic, and symbiotic diversities in strains nodulating clover in different soils in Spain*. *Canadian Journal of Microbiology*. 55, 10. p.1207-1216.
- Reinoso Sánchez B, Boto Fidalgo JA, González Morala M. 2007. *Variedades locales de alubia o judía grano (Phaseolus vulgaris L.) de la provincia de León*. Universidad de León. León, España
- REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. 2009. *Portaria 325 de 14 de setembro de 2009*. Diário Oficial da União-Seção 1. Nº 178, 17 de setembro de 2009. Brasília, Brasil. p. 4-30.
- RIBEIRO RA, BARCELLOS FG, THOMPSON FL, HUNGRIA M. 2009. *Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (Phaseolus vulgaris L.) reveals unexpected taxonomic diversity*. *Research in Microbiology*. 160, 4. p. 297-306.
- RIGAUD J, PUPPO A. 1975. *Indole-3-Acetic Acid catabolism by soybean bacterioids*. *Journal of General Microbiology*. 88. p. 223-228.
- RIVAS R, GARCÍA-FRAILE P, VELÁZQUEZ E. 2009. *Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes*. *Microbiology Insights*. 2. p. 51-69.
- RIVAS R, LARANJO M, MATEOS PF, OLIVEIRA S, MARTÍNEZ-MOLINA E, VELÁZQUEZ E. 2007a. *Strains of Mesorhizobium amorphae and Mesorhizobium tianshanense, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (ciceri) capable of nodulating Cicer arietinum*. *Letters in Applied Microbiology*. 44. p. 412-418.
- RIVAS R, PEIX A, MATEOS PF, TRUJILLO ME, MARTÍNEZ MOLINA E, VELÁZQUEZ E. 2007a. *Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils*. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer. Dordrecht, Holanda.
- RIVAS R, VELÁZQUEZ E, PALOMO JL, MATEOS PF, GARCÍA-BENAVIDES P, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2002b. *Rapid identification of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints*. *European Journal of Plant Pathology*. 108. p. 179-184.
- RIVAS R, VELÁZQUEZ E, VALVERDE A, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2001. *A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species*. *Electrophoresis*. 22. p. 1086-1089.
- RIVAS R, VELÁZQUEZ E, WILLEMS A, VIZCAÍNO N, SUBBA-RAO NS, MATEOS PF, GILLIS M, DAZZO FB, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2002a. *A new species of Devosia that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume Neptunia natans (L.f.) druce*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. p. 5217-5222.
- ROBLEDO M, JIMÉNEZ ZURDO JI, VELÁZQUEZ E, TRUJILLO ME, ZURDO PIÑEIRO JL, RAMÍREZ BAHENA MH, RAMOS B, DÍAZ MINGUEZ JM, DAZZO F, MARTÍNEZ-MOLINA E, MATEOS PF. 2008. *Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 19. p. 7064-7069.

- RODIÑO AP, SANTALLA M, DE RON AM, JJ DREVON. 2005. *Variability in nitrogen symbiotic fixation of white landraces of common bean from the Iberian Peninsula*. Symbiosis. 40. p.69-78.
- RODRÍGUEZ H, DE LAS RIVAS B, MUÑOZ R. 2007. *Efficacy of recA gene sequence analysis in the identification and discrimination of Lactobacillus hilgardii strains isolated from stuck wine fermentations*. International Journal of Food Microbiology. 115. p. 70-78.
- RODRÍGUEZ H, FRAGA R. 1999. *Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion*. Biotechnology Advances, 17. p. 319-339.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO DN, BUENDÍA AM, CAMACHO M, LUCAS MM, SANTAMARÍA C. 2000. *Characterization of Rhizobium spp. bean isolates from South-West Spain*. Soil Biology and Biochemistry, 32, 11-12. p. 1601-1613.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO DN, SANTAMARÍA C, TEMPRANO F, LEIDI EO. 1999. *Interaction effects between Rhizobium strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition*. European Journal of Agronomy. 11. p.131-143.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO DN, VIDEIRA E CASTRO, I, ALBAREDA M, TEMPRANO F. 2009. *Presente y futuro de los biofertilizantes en Iberoamérica: Península Ibérica*. Red CYTED: Fertilizantes biológicos para la agricultura y el medio ambiente - BIOFAG. La Habana, Cuba. (libro de actas de la reunión).
- RON AM; CASQUERO PA; GONZÁLEZ AM, SANTALLA M. 2004. *Environmental and genotypic effects on pod characteristics related to common bean quality*. Journal of Agronomy and Crop Science. 190. p. 1-8.
- ROSAS SB, ROVERA M, ANDRÉS JA, CORREA NS. 2007. *Effect of phosphorous solubilizing bacteria on thr rhizobia-legume symbiosis*. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. Dordrecht, Holanda
- ROSSI F, DELLAGLIO F, TORRIANI S. 2006. *Evaluation of recA gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria*. Systematic and Applied Microbiology. 29. p. 463-469.
- ROUGHLEY RJ, PULSFORD DJ. 1982. *Production and control of legume inoculants*. En: Vincent JM (ed). Nitrogen Fixation in Legumes. p. 1933-2009. Academic Press. Sydney, Australia.
- ROUGHLEY RJ, VINCENT JM. 1967. *Growth and survival of Rhizobium spp. in peat culture*. Journal of Applied Bacteriology. 30. p. 362-376.
- RUBENCHIK LI. 1963. *Azotobacter and its use in agriculture*. Academy of sciences of the Ukrainian SSR, Microbiological Institute D.K. Zabolotnyi. Israel programme for scientific translations. Jerusalén, Israel. (de un texto ruso publicado en 1960).
- RUBIO PÉREZ LM. 1987. *La Bañeza y su tierra, 1650-1850. Un modelo de sociedad rural leonesa*. Universidad de León. León, España
- RUFFO ML, BULLOCK DG, BOLLERO GA. 2004. *Soybean yield as affected by biomass and N uptake of cereal rye in winter cover crop rotations*. Agronomy Journal. 96. p. 800-805.
- RUSTIGIAN R, STUART S. 1941. *Decomposition of urea by Proteus*. Biol Medic. 47. p. 108-112.
- SAITOU N, NEI M. 1987. *The neighbor-joining method: a new method for eonstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology

- Evolution. 4. p. 406–425.
- SANTALLA M, RODIÑO AP, DE RON AM. 2002. *Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for common bean*. Theoretical Applied Genetics. 104. p.934-944.
- SANTILLANA N, RAMÍREZ-BAHENA MH, GARCÍA-FRAILE P, VELÁZQUEZ E, 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*. Archives of Microbiology. 189. p. 239-247.
- SAWADA H, KUYKENDALL LD, YOUNG JM. 2003. *Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts*. Journal of General and Applied Microbiology. 49. p. 155-179.
- SAXENA AK, REWARI RB. 1992. *Differential responses of chickpea (Cicer arietinum L.) Rhizobium combinations to saline soil conditions*. Biology and Fertility of Soils 13. p 1-10.
- SEGOVIA L, YOUNG JPW, MARTINEZ-ROMERO E. 1993. *Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type I strains as Rhizobium etli sp. nov.*. International Journal of Systematic Bacteriology. 43. p. 374-377.
- SILIM SN, SAXENA MC. 1992. *Comparative performance of some faba bean (Vicia faba) cultivars of constringing plant types. 1. Yield, yield components and nitrogen fixation*. Journal of Agricultural Science. 118. p. 325-332.
- SILVA C, VINUESA P, EGUIARTE LE, MARTÍNEZ-ROMERO E, 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. p. 884-893.
- SILVA MG, ARF O, SÁ ME, FERREIRA RODRIGUES RA, BUZZETTI S. 2004. *Nitrogen fertilization and soil management of winter common bean crop*. Scientia Agricola. 61, 3. p. 307-312.
- SILVEIRA PM, SILVA SF, STONE LF, SILVA JG. 2000. *Efeitos do preparo do solo, plantio direto e rotações de culturas sobre o rendimento e a economicidade do feijoeiro irrigado*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 36, 2. p. 257-263.
- SINCLAIR MJ, EAGLESHAM ARJ. 1984. *Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia*. Soil Biology and Biochemistry. 16. p. 247-251.
- SMIL V. 2001. *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production*. MIT press. Cambridge, EE.UU.
- SMITH RS. 1992. *Legume inoculant formulation and application*. Canadian Journal of Microbiology. 38. p. 485-492.
- SNEATH PHA, SOCAL RR. 1973. *Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman. San Francisco, EE.UU.
- SNEATH PHA. 2001. *Numerical Taxonomy*. En: Garrity G (ed). Bergey's Manual, p. 39-42. Springer-Verlag. EE.UU.
- SOMASEGARAN P. 1985. *Inoculant production with diluted liquid cultures of Rhizobium spp. and autoclaved peat: evaluation of diluents, Rhizobium spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness*. Applied and Environmental Microbiology. 11. p. 398-405.
- SPRENT JI. 2005. *Evolution and diversity of legume symbiosis*. En: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds). Nitrogen

Fixing Leguminous Symbioses. Springer. Dordrecht, Holanda.

- STACEY G. 2007. *The Rhizobium-Legume Nitrogen-Fixing Symbiosis*. En: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Springer. Elsevier. Amsterdam, Holanda.
- STACKEBRANDT E, FREDERIKSEN W, GARRITY GM, GRIMONT PA, KÄMPFER P, MAIDEN MC, NESME X, ROSSELLÓ-MORA R, SWINGS J, TRUPER HG, VAUTERIN L, WARD AC, WHITMAN WB. 2002. *Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52. p. 1043-1047.
- STEPHENS JHG, RASK HM. 2000. *Inoculant production and formulation*. *Field Crops Research*. 65. p. 249-258.
- STEPKOWSKI T, HUGHES CE, LAW IJ, MARKIEWICZ L, GURDA D, CHLEBICKA A, MOULIN L. 2007. *Diversification of lupine Bradyrhizobium strains: evidence from nodulation gene trees*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73. p. 3254-3264.
- STOCCO P, SANTOS JCP, VARGAS VP, HUNGRIA M. 2008. *Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) em Santa Catarina*. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 32. p. 1107-1120.
- STONE LF, MOREIRA MAA. 2000. *Efeitos de sistemas de preparo do solo no uso da água e na produtividade do feijoeiro*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 34. p.83-91.
- STUART C, STRATUM E, RUSTIGIAN R. 1945. *Further studies on urease production by Proteus pand related organims*. *Journal of Bacteriology*. 49. p. 437-444.
- STURZ AV, CHRISTIE BR. 2003. *Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria*. *Soil & Tillage Research*. 72. p.107-123.
- SUBRAMANIAM B, BABU CR. 1993. *Intrinsic antibiotic resistance among rhizobia isolated from sub-tropical Himalayan legumes*. *Soil Biology and Biochemistry*. 25. p.1057-1060.
- SURANGE S, WOLLUM AG, KUMAR N, NAUTIYAL CS. 1997. *Characterization of Rhizobium from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils*. *Canadian Journal of Microbiology*. 43. p. 891-894.
- TAIZ L, ZEIGER E. 2006. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood City, EE.UU.
- THIES JE, SINGLETON PW, BOHLOOL BB. 1991. *Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced previous rhizobia on field-grown legumes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57. p. 19-28.
- THOMPSON CC, THOMPSON FL, VANDEMEULEBROECKE K, HOSTE B, DAWYNDT P, SWINGS J. 2004. *Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54. p. 919-924.
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAC F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. 1997 *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Research*. 24. p. 4876-4882.
- TAI CM, FRASCH CE. 1982. *A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels*. *Analytical Biochemistry*. 119. p. 115-119.
- TURCO RF, BEZDICEK DF. 1987. *Diversity within two serogroups of Rhizobium leguminosarum native to soils in the Palouse of eastern*

- Washington. Annual Reviews in Microbiology. 111. p. 103-114.
- URBANO B, GONZÁLEZ-ANDRÉS F, BALLESTEROS A. 2006. *Allelopathic potential of cover crops to control weeds in Barley*. Allelopathy Journal. 17. p. 53-64.
- URBANO TERRÓN P. 2002. *Fitotecnia. Ingeniería de la producción vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- URCHEI MA, RODRIGUES JD, STONE LF. 2000. *Análise de crescimento de duas cultivares de feijoeiro sob irrigação, em plantio direto e preparo convencional*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 35. p. 497-506.
- VALENCIANO JB, CASQUERO PA, BOTO JA, GUERRA M. 2006. *Effect of sowing techniques and seed pesticide application on dry bean yield and harvest components*. Field Crops Research. 96. p.2
- VALENCIANO JB, CASQUERO PA, BOTO JA. 2004. *Influence of sowing techniques and pesticide application on the emergence and the establishment of bean plants (Phaseolus vulgaris L.)*. Agronomie. 24, 2. p. 113
- VALVERDE A, IGUAL JM, PEIX A, CERVANTES E, VELÁZQUEZ E. 2006. *Rhizobium lusitanum sp. nov. a bacterium that nodulates Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56. p. 2631 - 2637.
- VALVERDE A, VELÁZQUEZ E, FERNÁNDEZ-SANTOS F, VIZCAÍNO N, RIVAS R, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E, IGUAL JM, WILLEMS A. 2005. *Phyllobacterium trifolii sp. nov., nodulating Trifolium and Lupinus in Spanish soils*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55. p. 1985-1989.
- VAN BERKUM P, BEYENE D, BAO G, CAMPBELL TA, EARDLY BD (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, BEYENE D, EARDLY BD. 1996. *Phylogenetic relationships among Rhizobium species nodulating the common bean (Phaseolus vulgaris)*. International Journal of Systematic Bacteriology. 46. p. 240-244.
- VAN SCHOONHOVEN A, VOYSEST O. (eds) 1991. *Common Beans. Research for Crop Improvement*. CAB International y CIAT. Wallingford, Reino Unido, y Cali, Colombia
- VELÁZQUEZ E, IGUAL JM, WILLEMS A, FERNANDEZ MP, MUNOZ E, MATEOS PF, ABRIL A, TORO N, NORMAND P, CERVANTES E, GILLIS M, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2001b. *Mesorhizobium chacoense sp. nov., a novel species that nodulates Prosopis alba in the Chaco Arido region (Argentina)*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51. p. 1011-1021.
- VELÁZQUEZ E, MARTÍNEZ-ROMERO E, RODRÍGUEZ-NAVARRO DN, TRUJILLO ME, DAZA A, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E, VAN BERKUM P. 2001a. *Characterization of rhizobial isolates of Phaseolus vulgaris by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA*. Applied and Environmental Microbiology. 67. p. 1008-1010.
- VELÁZQUEZ E, PEIX A, ZURDO-PIÑEIRO JL, PALOMO JL, MATEOS PF, RIVAS R, MUÑOZ-ADELANTADO E, TORO N, GARCÍA-BENAVIDES P, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2005 *The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in Rhizobium rhizogenes strains enables them to induce nodules and tumours or hairy roots in plants*. Molecular Plant Microbe Interactions. 18. p.1325-1332
- VERSALOVIC H, SCHNEIDER M, DE BRUIJN FH, LUPSKI JR. 1994. *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*. Methods of Molecular and Cellular Biology. 5. p.25-40.

- VILLAMIL BANGEL E. 2009. *Presente e futuro dos biofertilizantes em países Ibero-Americanos: Visão geral da situação atual dos inoculantes no Brasil*. Red CYTED: Fertilizantes biológicos para la agricultura y el medio ambiente - BIOFAG. La Habana, Cuba. (libro de actas de la reunión).
- VINCENT JM. 1970. *The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia*. En: Vincent JM (ed). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule*. p. 1-13. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Reino Unido.
- VINUESA P, LEÓN-BARRIOS M, SILVA C, WILLEMS A, JARABO-LORENZO A, PÉREZ-GALDONA R, WERNER D, 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55. p. 569-575.
- VINUESA P, SILVA C, LORITE MJ, IZAGUIRRE-MAYORAL ML, BEDMAR EJ, 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 ET, ROGEL MA, GARCIA-DE LOS SANTOS A, MARTINEZ-ROMERO J, CEVALLOS MA, MARTINEZ-ROMERO E. 1999a. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49. p. 1479-1491.
- WANG ET, VAN BERKUM P, SUI XH, BEYENE D, CHEN WX, MARTÍNEZ-ROMERO E. 1999b. *Diversity of rhizobia associated with Amorpha fruticosa isolated from Chinese soils and description of Mesorhizobium amorphae* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49. p. 51-65.
- WATERS JK , HUGHES BL, PURCELL LC, GERHARDT KO, MAWHINNEY TP, EMERICH DW. 1998. *Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA*. 95. p. 12038-12042.
- WEI HG, TAN ZY, ZHU ME, WANG ET, HAN SZ, CHEN WX. 2003. *Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus and Lespedeza grown in the Loess Plateau of China and description of Rhizobium loessense* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53. p. 1575-1583.
- WERNEGREEN JJ, RILEY MA. 1999. *Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages*. *Molecular Biology Evolution*. 16. p. 98-113.
- WESTON LA. 1990. *Cover crop and herbicide influence on row crop seedling establishment in no-tillage culture*. *Weed Science*. 38. p.166-171.
- WESTON LA. 1996. *Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems*. *Agronomy Journal*. 88. p. 860-866.
- WHEATLEY DM, MACLEOD DA, JESSOP RS. 1995. *Influence of tillage treatments on N₂ fixation of soybean*. *Soil Biology and Biochemistry*. 27. p. 571-574.
- WHITE JW, LAING DR. 1989. *Photoperiod response of flowering in diverse genotypes of common bean (Phaseolus vulgaris)*. *Field Crops Research*. 22. p. 113-128.
- XAVIER JC, GERMIDA JJ. 2002. *Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy*. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 2. p. 181-188.
- YANAGI M, YAMASATO K. 1993. *Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA*

- gene using PCR and DNA sequencer*. FEMS Microbiology Letters. 107. p. 115-120.
- YANG JK, XIE FL, ZOU J, QIN Z, ZHOU JC. 2005. *Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (Arachis hypogaea) in China*. Soil Biology and Biochemistry 37. p.141–153.
- YATES RJ, HOWIESON JG, REEVE WG, BRAU L, SPEIJERS J, NANDASENA K, REAL D, SEZMIS E, O'HARA GW. 2008. *Host-strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between Trifolium spp. and Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. Soil Biology and Biochemistry. 40. p. 822-833.
- YOUNG JM, KUYKENDALL LD, MARTÍNEZ-ROMERO E, KERR A, SAWADA H. 2001. *A revision of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51. p. 89-103.
- YOUNG JPW, HAUKKA KE. 1996. *Diversity and phylogeny of rhizobia*. New Phytologist. 133. p. 87-94.
- YOUNG JPW. 1996. *Phylogeny and taxonomy of rhizobia*. Plant and Soil. 186. p. 45-52.
- ZEIGLER DR. 2003. *Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53. p. 1893-1900.
- ZURDO-PIÑEIRO JL, VELÁZQUEZ E, LORITE MJ, BRELLES-MARIÑO G, SCHRÖDER EC, BEDMAR EJ, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E. 2004. *Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as Rhizobium gallicum and Rhizobium tropici*. Systematic and Applied Microbiology. 27. p. 469-477.

