

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**Agencia Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Estación Experimental del Zaidín-Granada**



Programa de Doctorado: Microbiología

Tesis Doctoral

**Biodiversidad microbiana en chacras maiceras de Allpas
(Acobamba, Huancavelica, Perú) cultivadas bajo el sistema
tradicional andino**

Gregorio José Arone Gaspar

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Gregorio José Arone Gaspar
D.L.: GR 730-2013
ISBN: 978-84-9028-412-4

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Estación Experimental del Zaidin-Granada

Programa de Doctorado: Microbiología

Tesis Doctoral

Biodiversidad microbiana en chacras maiceras de Allpas (Acobamba,
Huancavelica, Perú) cultivadas bajo el sistema tradicional andino

Memoria que presenta el Ingeniero Agrónomo
Don Gregorio José Arone Gaspar

para aspirar al grado de Doctor

Fdo: Gregorio José Arone Gaspar

VºBº del Director de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Eulogio José Bedmar Gómez
Doctor en Ciencias Biológicas
Profesor de Investigación de la Agencia CSIC

Esta Tesis Doctoral se ha realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos (Grupo de investigación “Metabolismo del Nitrógeno”) de la Estación Experimental del Zaidín (Agencia CSIC), Granada, durante los años 2009-2012.

La estancia y realización del presente trabajo por el Ing°. Gregorio José Arone Gaspar fue posible gracias a una beca doctoral otorgada por el Programa Internacional de Becas de la Fundación Ford-IFP AR&SC-Instituto de Estudios Peruanos (IEP)-Perú, Cohorte N° 7, ID N° 15082226.

DEDICATORIA

A mis padres, Corina y Jesús, por darme la vida y enseñarme a insistir a salir adelante. Padre, aunque ya estás descansando tus palabras guían mi vida. Gracias papá y mamá.

A mi amada Dafny Cecilia, esposa mía, lo poco que se pudo hacer con el tiempo que te robé de estar a tu lado y de nuestros hijos, está plasmado en las hojas siguientes. Gracias por inyectar siempre esas palabras de tranquilidad "...que nosotros estamos bien...".

A mis hijos, Dafny Corina y José Paolo, la fuerza inagotable que siempre me ha mantenido vivo en los momentos más difíciles durante mi estancia en Granada.

A mi tío Simón, gracias por esas palabras de aliento y de acompañamiento a Cecico, a Coni y Jopa

A mis hermanos Luis, Beatriz, Antero, Lucía, Isabel, Beto, Berci, Hermelinda, Geovan y Carlos, por motivarme a seguir con este emprendimiento, y por medio de ustedes hacer extensivo mi reconocimiento a toda nuestra familia.

A los ayllus de Oyolo (Paucar del Sara Sara-Ayacucho), de Allpas (Acobamba-Huancavelica), y demás comunidades vivas, donde se continua cultivando las chacras como nos enseñaron nuestros padres desde Huayna Cápac y Mama Ocllo.

RECONOCIMIENTO

A la Fundación Ford por permitir formar parte de su grupo de becarios. A Cecilia Israel, Elsa Elías, Jorge Reyes, Anita Rojas, Lula Álvarez, y a todos los demás, por estar siempre pendientes desde que fui seleccionado, durante mi estancia en Granada y hasta la vuelta a casa. Gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. Eulogio J. Bedmar, director de la tesis, amigo y maestro. Gracias Eulogio, siempre estuviste pendiente en todo momento de mi formación y hasta en la puerta del quirófano procurando que todo saliera bien. Llevo muchos recuerdos de enseñanza y las clases de redacción. Finalmente, te agradezco por encaminarme a entender la biodiversidad en la vida de las comunidades campesinas.

Al Dr. Juan Sánchez Raya. Gracias Juan por las constantes sugerencias en el proceso de la tesis, y tu acompañamiento durante mi rehabilitación.

A la familia EBG, amigos maravillosos de todo momento, en las alegrías y en las tristezas, siempre estuvieron presente. Gracias María Jesús, Soco, Silvia, Germán, David, Sergio, Manolo, Chudi, Juan, Alba, Emilio, Eduardo, Chouhra, Maribel, Nieves, por ese estímulo incansable, por compartir los conocimientos y permitirme aprender de cada uno de ustedes. Gracias de todo corazón amigos, y nunca olviden que allá en los Andes tienen a un hermano.

A todos mis amigos de Perú, quienes desde la distancia me han acompañado, siempre con palabras de aliento y buena energía.

A los amigos Manolo, Harry, Pepe y Pablo. Gracias por ayudarme a salir de cada duda que se me presentaba desde la preparación de las muestras para la pirosecuenciación y su posterior análisis. Gracias amigos.

Finalmente a todos los amigos de la Estación Experimental del Zaidín, con quienes pasé gratos momentos. En especial a los amigos de vigilancia a Pedro, Jesús y Mari Carmen.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se han presentado en las siguientes reuniones científicas:

III Congreso Nacional de Biodiversidad

Participación: Comunicación oral

Título: Estudio de la biodiversidad microbiana en chacras maiceras mediante pirosecuenciación.

Lugar de realización y fecha: Granada, España, 8-10 de junio de 2011

Autores: Arone G., Fernandez-Gonzalez A. J., Fernandez-Lopez M., Correa D. y Bedmar E. J

XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Participación: Póster

Título: *Ensifer medicae* es el endosimbionte del trébol andino (*Medicago hispida* G.) de las chacras maiceras andinas

Lugar de realización y fecha: Barcelona-España, 5 - 8 de septiembre 2011

Autores: Arone G. y Bedmar E. J

Forum CYTED-IBEROEKA 2011

Seguridad Alimentaria: Tecnologías para la Producción y la Calidad

Participación: Comunicación oral

Título: Cultivo de maíz amiláceo en chacras campesinas andinas del Perú: razones para su producción sustentable.

Lugar de realización y fecha: República Dominicana, 5 - 6 de diciembre de 2011

Autores: G. J. Arone Gaspar y E. J. Bedmar

IV Jornada de la AEL y V seminario de la Judía

Participación: Póster.

Título: Importancia de *Medicago hispida* G. en las chacras maiceras de la región quechua del Perú

Lugar de realización y fecha: Pontevedra, 6 y 7 de junio de 2012.

Autores: Arone, G.; Ruíz, D.; Mantari, J.; Moreno, S.; Bedmar, E. J.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
ACC	Amino Ciclo propano Carboxílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido Indol Acético
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
<i>atpD</i>	Subunidad beta de la ATP sintasa
BLAST	Basic local alignment search tool
Bootstrap	Análisis de confianza
bp	Pares de bases de nucleótidos
CIC	Capacidad de Intercambio de Cationes
DDBJ	ADN DataBank of Japan
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
emPCR	PCR en emulsión
EPS	Exopolisacárido
F	Forward
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
<i>glnII</i>	Glutamina sintetasa II
ha	Hectárea
kbp	Kilo pares de bases
MID	Múltiples identificadores
MINAG	Ministerio de Agricultura del Perú
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
NGS	Next Generation Sequencing
NJ	Neighbour joining
<i>nodC</i>	N-acetylglucosaminyltransferasa

nt	Nucleótidos
° C	Grados centígrados
OIA	Oficina de información agraria
ONU	Organización de las Naciones Unidas
ORF	Open reading frame
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
pb	Pares de bases de nucleótidos
PCR	Polimerase chain reaction
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
ppm	Partes por millón
R	Reverse
r.p.m.	Revoluciones por minuto
rDNA	Ribosomal DNA
RDP	Ribosomal Database Project II
<i>recA</i>	ADN recombinasa A
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
rRNA	ribosomal RNA
SDS	Dodecil sulfato sódico
sp	Especie
T	Cepa Tipo
t	Tonelada
TAE	Tris-acético-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Ácido bórico - EDTA
TE	10 mM Tris (pH 8.0) : 1 mM EDTA (pH 8.0)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias
USDA	United States Department of Agriculture
V	Voltio
v	Volumen
WGA	Whole genome amplification
YEM	Levadura Manitol Agar
®	Marca registrada

Glosario

Apu: Cerro tutelar. Son salvajes, de difícil acceso.

Ayllu: Es la comunidad familiar extensa originaria de la región andina con una descendencia histórica o admitida, quienes trabajan en forma colectiva en un territorio de propiedad común llamado laymi. El reconocimiento a un miembro como parte del ayllu, le otorga derechos y deberes dentro de una comunidad.

Ayni: Sistema de trabajo de reciprocidad familiar entre los miembros del ayllu, "hoy por ti, mañana por mí".

Chacra: Es la transformación del paisaje natural en paisaje agropecuario. Su área es variable. Se considera también como la unidad celular de la agricultura andina, donde acontece el reencuentro de humanos, la naturaleza y el universo.

Chakitaklla: Es el arado de pie, símbolo de la milenaria tradición agrícola andina.

Chicha: Es la bebida incaica y elemento integrador de los ayllus. Se elabora principalmente de la fermentación del maíz y otros cereales originarios de América. En menor medida, se suele preparar a partir de la fermentación de otros frutos como el higo y el molle.

Diazotrofa: Bacterias capaz de fijar dinitrógeno (N₂) atmosférico.

Endofito: Microorganismo que coloniza tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta

Exudado radicular: Son todos aquellos compuestos orgánicos liberados al exterior por raíces de plantas sanas e intactas. Los factores que pueden afectar son la edad de la planta, temperatura, luz, nutrición, medio de cultivo y enfermedades radiculares.

Pachamama: Es la madre universal de la vida, madre naturaleza (Madre Tierra). Es divina, y es persona femenina viviente en la concepción andina

Pirosecuenciación: Tecnología de determinación de secuencias de DNA a gran escala.

Reciprocidad: Es el principio de la equidad comunitaria en el ayllu.

Región quechua: Es la región que se encuentra presente a ambos lados de la cordillera de los Andes en el Perú y se ubica entre los 2300 y los 3500 m.s.n.m.

Rizosfera: Es el suelo inmediato a las raíces donde tiene lugar una elevada interacción dinámica con los microorganismos.

Ritual de producción: Es el diálogo respetuoso del hombre andino con la pachamama, que moviliza además la inmensa fuerza de la tradición y los antepasados. Se realiza para pedir licencia y la abundancia de la nueva crianza, siempre en reciprocidad, no violento sino de adaptación y sin hacer daño al ambiente que le rodea.

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR): Son bacterias beneficiosas que se encuentran en el suelo (rizosférico y no rizosférico) y como endofito en las raíces de las plantas. Son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta.

Siembra en chaqro: Es la siembra diversificada de cultivos en una misma chacra y su producción tiene un rol social transcendental en la dieta alimentaria de las familias.

Simbiosis: Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, sobre todo si los simbiosntes sacan provecho de la vida en común.

RESUMEN

En la región quechua de los Andes peruanos, localizada entre los 2.400 y 3.500 m sobre el nivel del mar, los campesinos continúan las prácticas agrícolas heredadas de sus antepasados para el cultivo de maíz amiláceo en sus pequeñas y dispersas chacras. Las chacras son pequeñas extensiones de terreno (200-10.000 m²) que, por regla general, se asientan en suelos superficiales, donde la dinámica y sostenibilidad de su fertilidad natural es muy frágil. Las chacras se siembran con semillas propias de la comunidad, se abonan con el estiércol de su ganado, principalmente vacuno y ovino, y sin riego artificial en la mayoría de los casos.

Una característica del cultivo de maíz en las chacras maiceras de los Andes peruanos es que crece asociado al denominado trébol andino, una leguminosa (*Medicago hispida* G.), que aparece innata y se desarrolla simultáneamente con él. Los campesinos no suelen cosechar el trébol sino que lo dejan en la chacra para alimento del ganado cuyo pastoreo contribuye a mezclar los restos vegetales con el suelo de las chacras. Las chacras no se abonan con fertilizantes químicos y, en la experiencia campesina, el empleo de abonos nitrogenados resulta en la pérdida de la fertilidad de la chacra.

Por su excelente fertilidad, demostrada a lo largo de miles de años, la chacra constituye un sistema modelo para analizar el papel de los microorganismos del suelo en la estabilidad de los cultivos y en la sostenibilidad de la producción de las plantas que se producen en ellas.

En esta Memoria de Doctorado se plantea, en primer lugar, el aislamiento y caracterización de las bacterias endosimbióticas de los nódulos de plantas de *M. hispida* cultivadas en chacras maiceras de Allpas (Acobamba-Huancavelica, Perú). Por otra parte, se analiza la diversidad microbiana en suelo rizosférico y no rizosférico de plantas de maíz asociado a trébol cultivado de forma tradicional, de maíz tratado con fertilizantes químicos, de maíz sólo y de trébol andino. Finalmente, se estudia la diversidad de bacterias endofitas de las raíces de maíz asociado a trébol. Es de esperar que en un escenario como es el de las chacras andinas, donde la presión antropogénica es escasa, los resultados obtenidos serán consecuencia de la evolución natural de los microorganismos de y de sus interacciones con los cultivos que se desarrollan en las chacras.

El aislamiento y caracterización de las bacterias endosimbióticas de los nódulos formados en *M. hispida* se ha llevado a cabo mediante técnicas moleculares, de manera que la amplificación y secuenciación de los genes esenciales 16S rRNA, *atpD*, *glnII* y *recA*, junto con el del gen simbiótico *nodC*, ha permitido establecer que *Ensifer medicae* es la Alphabacteria responsable de la formación de nódulos en *M. hispida*.

Los estudios de biodiversidad microbiana de los suelos rizosféricos y no rizosféricos de los diferentes cultivos se llevan a cabo utilizando pirosecuenciación que, de los métodos disponibles para el análisis de la diversidad microbiana en muestras medioambientales, es, por el momento, la técnica que suministra mayor información. Para cada tipo de suelo, el número de secuencias normalizadas es de 9.966, a partir de las cuales se calculan los índices habituales de biodiversidad alpha y beta, y se establecen las correspondientes curvas de rarefacción. De acuerdo con los resultados obtenidos, el empleo de la pirosecuenciación ha permitido analizar entre el 85,81% y el 90,04% de la biodiversidad microbiana de los suelos rizosféricos y no rizosféricos examinados. Para cada tipo de suelo y de cultivo se presentan los géneros más abundantes y se realiza el estudio comparativo entre ellos, de manera que se pueden analizar las variaciones en las poblaciones microbianas ocurridas por influencia de la rizosfera de las plantas. En general, los resultados indican la existencia de una mayor biodiversidad en los suelos rizosféricos y que la planta, de alguna manera, promueve la abundancia de determinados géneros.

En el apartado sobre la diversidad de bacterias endofitas de las raíces de maíz, se analiza la diversidad utilizando métodos dependientes del cultivo celular y mediante pirosecuenciación. Mientras que sólo se aíslan 3 géneros diferentes con el primer método, la pirosecuenciación permite identificar 180 géneros. Aunque a la pirosecuenciación se le puede criticar que se trata de una metodología que no permite la obtención de las células vivas, su capacidad de análisis de la diversidad microbiana es enorme. Aunque se han publicado diversos trabajos sobre las bacterias endofitas de las raíces de maíz, es la primera vez que se emplea pirosecuenciación para estudiar la biodiversidad microbiana en ellas.

Finalmente, se realiza un esfuerzo extraordinario para tratar de asignar a los diferentes géneros de los distintos suelos y de los endofitos de las raíces una función como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). De esta manera, se describen 430 géneros correspondientes a la biodiversidad total (suelos + endofitos), de los que 86 se han identificado como posibles PGPRs por tener capacidad para fijar N_2 , producir fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas, etc), poseer actividad ACC-deaminasa, solubilizar fosfato, intervenir en procesos de biocontrol, etc. etc. Sin lugar a dudas que estas actividades biológicas podrían explicar gran parte de la fertilidad de los suelos de las chacras.

Además de su contenido científico, la labor de investigación realizada tiene una prolongación social de gran interés para los campesinos indígenas de los Andes peruanos. Es previsible que el trabajo realizado utilizando suelo de las chacras de la comunidad quechua de Allpas sirva para mejorar las condiciones alimentarias y económicas de la comunidad ya que el maíz que ellos producen repercute en su seguridad alimentaria y económica ya que se emplea como moneda de cambio en los cercanos mercados locales y regionales. Con los datos obtenidos podrían definirse diferentes formulaciones de bioinoculantes para su empleo en la recuperación de suelos de escasa fertilidad o mejorar aquellos que han permanecido en descanso.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1. La agricultura andina	2
1.2. La siembra tradicional de la <i>sara mama</i> (maíz amiláceo)	4
1.3. La asociación natural del maíz amiláceo con el trébol andino	6
1.4. Ciclo del N: Fijación biológica del N ₂	7
1.5. Simbiosis fijadoras de N ₂ en plantas leguminosas	8
1.6. La comunidad microbiana en el suelo	11
1.7. Importancia de los microorganismos del suelo	12
1.8. La rizosfera	14
1.9. Bacterias endófitas	18
1.10. Diversidad bacteriana del suelo y sistemas de estudio	21
1.10.1. Estudio de la diversidad bacteriana basada en métodos dependientes de cultivo	21
1.10.2. Estudio de la diversidad bacteriana basada en métodos independientes de cultivo	22
1.10.3. Marcador filogenético universal: El gen 16S rRNA	22
1.11. Metagenómica	24
1.12. Pirosecuenciación	26
1.12.1. Preparación de la librería de ADN	27
1.12.2. Reacción de pirosecuenciación	27
2. Objetivos	32
3. Material y Métodos	35
3.1. Localización geográfica	36
3.2. El cultivo de maíz en la comunidad campesina de Allpas	36
3.3. El trébol andino	38
3.4. Medio de cultivo bacteriano	39
3.4.1. Medio YEM (Yeast Extract Mannitol)	39
3.5. Conservación de cepas bacterianas	39
3.6. Toma de muestras de suelo para análisis de sus propiedades físico-químicas	40
3.7. Toma de muestras de trébol andino para análisis foliar	40
3.8. Nomenclatura de las muestras	40
3.8.1. Para plantas y suelos	40
3.8.2. Para endófitos	41

3.9. Experimentos de planta trampa	41
3.9.1. Preparación de macetas y siembra de semillas	41
3.9.2. Esterilización de nódulos y aislamiento de sus endosimbiontes	42
3.10. Identificación genotípica de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino	42
3.10.1. Cultivo bacteriano	42
3.10.2. Obtención de ADN genómico	42
3.11. Identificación de endofitos aislados de nódulos	43
3.11.1. Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-Polymerase Chain Reaction (PCR) (REP-PCR).	43
3.11.2. Amplificación del gen 16S rRNA	45
3.11.3. Amplificación y secuenciación de los genes, <i>glnII</i> , <i>atpD</i> y <i>recA</i>	46
3.11.4. Amplificación y secuenciación del gen de nodulación <i>nodC</i>	47
3.11.5. Purificación de los productos de amplificación	49
3.11.6. Secuenciación de ADN y análisis informático de las secuencias	49
3.12. Experimentos de nodulación	50
3.12.1. Preparación de los inóculos	50
3.12.2. Esterilización de semillas	50
3.12.3. Cultivo de plantas en jarra Leonard	50
3.12.4. Solución mineral para el cultivo de plantas	51
3.13 Análisis de la diversidad bacteriana en las chacras maiceras	51
3.13.1. Toma de muestras de suelo rizosférico y no rizosférico	51
3.13.2. Extracción de ADN	52
3.13.3. Purificación del ADN	52
3.14. Aislamiento e identificación de endofitos de las raíces de plantas de maíz amiláceo	54
3.14.1. Experimentos de planta trampa	54
3.14.2. Esterilización de raíces y aislamiento de endófitos	54
3.14.3. Identificación de endofitos de las raíces de maíz amiláceo	55
3.14.4. Aislamiento de ADN de las raíces de maíz amiláceo	56
3.15. Pirosecuenciación	57
3.15.1. Amplificación del gen 16S rRNA	57
3.15.2. Purificación de los productos de amplificación	61
3.15.2.1. Purificación de los productos amplificados a partir de ADN procedente del suelo	61

3.15.2.2. Purificación de los productos amplificados a partir de ADN de las raíces de maíz	61
3.16. Preparación de las muestras para pirosecuenciación	62
3.17. Análisis de las secuencias procedentes de la pirosecuenciación	63
4. Resultados	64
4.1. Propiedades físico-químicas de los suelos de las chacras de Allpas	65
4.2. Análisis foliar del trébol andino (<i>M. hispida</i> G).	66
4.3. Identificación de endosimbiontes aislados de nódulos de trébol andino	67
4.4. Caracterización simbiótica de las cepas aisladas de <i>M. hispida</i>	85
4.5. Biodiversidad microbiana en las chacras maiceras de Allpas	86
4.5.1. Procesamiento de las secuencias procedentes de la pirosecuenciación	86
4.5.2. Clasificación y composición de la población microbiana	90
4.5.3. Diversidad bacteriana en las muestras de las librerías L-SR y L-SNR	105
4.5.4. Análisis comparativo de la estructura de las poblaciones microbianas en las muestras de las librerías L-SR y L-SNR	112
4.5.4.1. Análisis de los suelos rizosféricos	112
4.5.4.2. Análisis de los suelos no rizosféricos	112
4.5.4.3. Análisis de los suelos no rizosféricos vs suelos rizosféricos	113
4.5.4.4. Análisis taxonómico comparado de las poblaciones microbianas en suelos rizosféricos y no rizosféricos	114
4.5.4.4.1. Suelos cultivados con maíz y trébol (muestras MT-SR y MT-SNR)	114
4.5.4.4.2. Suelos cultivados con trébol (muestras T-SR y T-SNR)	115
4.5.4.4.3. Suelos cultivados con maíz fertilizado (muestras MF-SR y MF-SNR)	116
4.5.4.4.4. Suelos cultivados con maíz (muestras M-SR y M-SNR)	117
4.6. Aislamiento e identificación de endofitos de las raíces de maíz amiláceo	119
4.6.1. Método dependiente de cultivo celular	119
4.6.2. Método independiente de cultivo celular: Pirosecuenciación	119
4.6.3. Clasificación y composición de los endofitos de las raíces de maíz	120
4.6.4. Diversidad de endofitos en las raíces de maíz	125
4.7. Actividad PGPR general en suelos rizosféricos y no rizosféricos de las chacras maiceras	127
4.7.1. Chacra cultivada con maíz asociado a trébol	128
4.7.2. Chacra cultivada con trébol	128
4.7.3. Chacra cultivada con maíz fertilizado	128

4.7.4. Chacra cultivada con maíz	128
5. Discusión	139
6. Conclusiones	151
7. Referencias	153

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La agricultura andina

Entre 4.000 y 8.000 años antes de Cristo, en los Andes centrales de Sudamérica (Bolivia, Ecuador y Perú y), se forjó una agricultura autóctona como lo demuestran las evidencias sobre domesticación de diversas plantas encontradas en Tres Ventanas (Lima, Perú), Cueva de Guitarreros (Ancash, Perú), Cuevas de Ayacucho (Ayacucho, Perú) y Huaca Prieta (La Libertad, Perú) (Grillo et al. 1994; Pearsall 2008; Grobman et al. 2012). Estos inicios alcanzaron su máximo esplendor con las civilizaciones pre-inca e inca cuando se desarrolló una cultura agrocentrica, respetuosa con el medio ambiente y vinculada a la cosmovisión de la *Pachamama* (Madre Tierra) a través de la chacra (Grillo et al. 1994; Horkheimer 2004; Tapia y Fries 2007).

Según la cosmovisión campesina andina la *Pachamama* es divina, es la madre universal de la vida, y de ella surge la chacra. La chacra y todo lo que ella representa, desde las semillas, plantas y cosechas hasta los *Apus* (cerros tutelares) merecen respeto y cariño, y exigen cuidado responsable. El trabajo no es una simple actividad productiva sino un culto a la vida (Grillo et al. 1994; Tapia y Fries 2007). La chacra, en su expresión más concreta, se resume en la transformación del paisaje natural en paisaje agropecuario. La chacra es diversa, como lo son sus climas, suelos y plantas y, de ahí, que ninguna chacra andina sea idéntica. Según Grillo (1993), la chacra representa la reciprocidad, cariño y respeto entre la comunidad humana, la *Sallqa* (naturaleza) y todo cuanto existe.

Hacer chacra en los Andes no consiste en sembrar un cultivo en el tiempo que uno desee, y una imposición en este sentido suele conducir al fracaso, sino en buscar la sintonía con la naturaleza. Por esta razón los campesinos observan constantemente, y obtienen información, de las señales que ofrece la naturaleza, de manera que puedan predecir las variaciones del clima como las heladas, nevadas, granizadas, lluvias, sequías, etc. Los campesinos también observan, e interpretan, desde hace miles de años, el comportamiento de plantas, animales, suelo, astros, clima e incluso su propio sueño. Asimismo, se considera el tiempo de floración de las plantas señas, cultivadas o silvestres, el color del ocaso, presencia del arco iris, brillo del sol y de las pléyades, fases de la luna, sonido de los riachuelos, color de las nubes y su presencia en tal o cual cerro, bramar del toro, croar de los sapos, dirección y velocidad del viento, sensación de frío al tacto, etc. Sin lugar a dudas que las señales deben entenderse para interpretarse adecuadamente y obtener así la máxima información de ellas (PMA 2009; van Kessel y Salas 2002). Este conocimiento, logrado durante miles de años, permite a los campesinos hacer chacra en ambientes tan diversos como son los que ocurren en los Andes.

La chacra es la escuela abierta, sin paredes ni libros, donde se viven los saberes y se muestran las destrezas y habilidades desarrolladas para su crianza a los miembros de la familia, grupos de parentesco y comunidad. En el mundo andino nadie es, o se siente, propietario de todo el conocimiento. Quien quiera aprender vive y cría en la chacra, y se gana autoridad con el paso del tiempo. Para ello debe ser persona ejemplar, innovadora y, a la vez, saber conservar la mayor diversidad de plantas, recíproco en las actividades, fiel a la palabra empeñada sin documentos ni testigos y finalmente hace brillar la chacra donde cultiva.

Esta manera de ver y apreciar su entorno ha permitido a los campesinos, a lo largo de miles de años, forjar sistemas agrícolas sostenibles en los que los insumos son mínimos, apenas existen alteraciones y se exhiben interacciones complejas con la naturaleza, cultivos, suelos, animales, etc. Por esta razón, muchos agroecólogos los consideran escenarios óptimos para evaluar propiedades de estabilidad y sustentabilidad en comparación con otros sistemas agrícolas (Tabla 1.1) (Gleissman 2001).

Tabla 1.1 Características de los ecosistemas naturales, agrícolas sostenibles y agrícolas no sostenibles.

Características	Ecosistemas naturales	Sistemas agrícolas sostenibles	Sistemas agrícolas no sostenible
Producción	baja	baja/media	alta
Diversidad de especies	alta	media	baja
Resiliencia	alta	media	baja
Flexibilidad	alta	media	baja
Estabilidad de salida	media	baja/media	alta
Desplazamiento humanos por procesos ecológicos	baja	media	alta
Dependencia de insumos externos	baja	media	alta
Reciclado interno de nutrientes	alta	media/alta	baja
Sostenibilidad	alta	alta	baja

1.2. La siembra tradicional de la *sara mama* (maíz amiláceo)

Los campesinos de los Andes, sobre todo los que viven en las comunidades campesinas, mantienen la crianza de la chacra siguiendo costumbres ancestrales. Así lo atestiguan diversas evidencias, de las que una es la crianza de la *sara mama* (maíz amiláceo, *Zea mays* L.). Aunque en el Perú se siembra la *sara mama* desde la Costa hasta los 3.800 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), como es el caso del Lago Titicaca (Manrique 1997), el nicho maicero por excelencia se encuentra en la región Quechua de los Andes, localizada entre los 2.400 y 3.500 m.s.n.m. (Pulgar Vidal 1987), cuyas chacras se encuentran en suelos superficiales donde la dinámica y sostenibilidad de su fertilidad natural es muy frágil. Se ha estimado que alrededor de 200 a 300 mil hectáreas/año de suelo, de una profundidad media de 20 cm, se arrastran por acción de la erosión, hasta tal extremo que queda inútil para su cultivo (Zamora y Medina 1969).

Además, las chacras están sometidas a sequías, heladas, granizadas y lluvias torrenciales, razón por la que los campesinos siembran en diferentes momentos y altitudes, práctica que garantiza lograr la cosecha sea cual fuere el año agrícola. A ella se une la de sembrar en *chagro* (mezcla de cultivos), por lo que en la zona baja y media andina la siembra de maíz amiláceo se intercala con la de quinua (*Chenopodium quinoa*), poroto (*Phaseolus vulgaris*), achita (*Amarantus caudatus*) y calabaza (*Cucurbita ficifolia*), y en la zona alta se asocia, principalmente, con quinua, haba (*Vicia faba*) y arveja (*Pisum sativum*).

Los campesinos, en la mayoría de las ocasiones pertenecientes a diversas etnias indígenas, siembran sus propias semillas en múltiples y dispersas chacras cuya superficie oscila, por regla general, entre 200 y 10.000 m². Estas semillas se catalogan en más de 1.600 entradas agrupadas en 55 razas (Manrique 1997; Valladolid 2003). Resulta paradójico que las comunidades indígenas andinas, a veces desconocidas e incluso marginadas, sean las guardianas de la enorme riqueza que supone la diversidad de maíces que ellas cultivan. Puesto que cada vez se destinan menos recursos a estas comunidades, la desaparición de su agricultura tradicional resultaría en la disminución del germoplasma de los maíces amiláceos andinos y, por tanto, en la pérdida de diversidad de tales maíces (Valladolid 2003).

El maíz en las comunidades alto-andinas no sólo ofrece seguridad alimentaria y nutricional, ya que proporciona el 29% de calorías y proteínas, a las familias campesinas (Shiferaw et al. 2011), sino que, en un contexto más amplio, tiene un rol social y cultural. De hecho; se emplea como moneda de pago en especie para retribuir el trabajo, obsequio de

reciprocidad a familiares, trueque con otros productos, empleo en las ceremonias religiosas, regalos de boda, rituales de producción, conservación como semilla para la próxima campaña, etc. Además, el excedente se comercializa en los mercados locales y regionales. La *aqka* o *aswa* (chicha, resultado de la fermentación del maíz) se utiliza desde la época prehispánica como elemento integrador de los *ayllus* (comunidad familiar, descendiente de un lejano antepasado común, que trabaja de forma colectiva) y está presente en toda actividad agrícola, fiestas costumbristas, etc. (Jennings 2005; León y Zapata 2008). Por todas estas consideraciones a la *sara mama* se le quiere y respeta (Valladolid 2003).

La siembra en las chacras se realiza en un ambiente festivo, no requiere herramientas sofisticadas y en ella participan niños, jóvenes, adultos y ancianos. Las diferentes actividades agrícolas se realizan en *ayni* o *minka* (ayuda mutua), de modo que la chacra se atiende con minuciosidad en todo su proceso productivo. Además, no existe una única forma de hacer chacra, sino de muchas maneras dependiendo de su ubicación, tipo de suelo, pendiente del suelo, dotación de riego o en secano, variedades de maíz, etc., y cambia de familia a familia y de *ayllu* a *ayllu*.

Todas las labores agrícolas relacionadas con el maíz, y las de otros cultivos, se desarrollan ritualmente, con sus propios cantos y bailes, iniciándose con el pago a la *Pachamama*. Al finalizar la *hallma* (segundo aporque), los campesinos suelen extraer las mejores plantas, cargan con ellas y bailan alegremente. Otras veces se exhiben bailando en la fiesta de los carnavales, o en la fiesta de la Virgen de la Candelaria, cuyas andas se adornan con plantas verdes de maíz, y así sale en procesión.

La siembra del maíz en la región quechua marca el ciclo agrícola y se inicia con la presencia de las primeras lluvias de finales del mes de septiembre o inicios de octubre. Para la siembra se espera que la humedad del suelo permita su laboreo, lo que se lleva a cabo con tracción animal (yunta) en las partes planas y utilizando la *chakitaqlla* (arado andino) en los terrenos de difícil acceso como las laderas y los terrenos pedregosos. Por cada golpe de azada se depositan de dos a tres granos de maíz y se dejan unos 40 cm entre golpes. Cada 5-7 vueltas de la yunta se siembra quinua o habas. La chacra se abona con estiércol de ganado, principalmente vacuno y ovino, y no se emplean agroquímicos. A la semana de su siembra, el maíz comienza a emerger y cuando tiene entre 10-15 cm de altura se realiza la *qatma* (primer aporque) para controlar las plantas arvenses. Entre finales de diciembre y todo el mes de enero, cuando la precipitación es más acentuada, se realiza la *hallma*, esto es, remover el suelo para eliminar las malezas al tiempo que se acumula alrededor del cuello de las plantas

para darles soporte. Después del segundo aporque emerge en las chacras el trébol andino (ver apartado 1.3), que crece asociado al maíz hasta la cosecha. El maíz florece durante el mes de marzo, en abril comienzan a salir los primeros choclos (mazorcas), cuyos tiernos granos ya pueden consumirse y, finalmente, en junio se recoge el grano seco. Para la cosecha, las plantas de maíz se cortan a una altura de 15-20 cm sobre el nivel del suelo, se amontonan para que se sequen y luego se despanca, esto es, se quitan las brácteas para obtener la mazorca. Realizada la cosecha del maíz, las chacras quedan expuestas al pastoreo de los animales, período que coincide con las bajas temperaturas y ausencia de lluvias. Durante este tiempo los campesinos aprovechan para realizar diversas actividades como preparar la papa en *chuño* (papa deshidratada a baja temperatura), mejorar sus casas, visitas a otras ciudades, la fiesta del agua, fiesta de Santiago, amaestrar nuevas yuntas para la próxima siembra, etc.

Durante la campaña agrícola 2009-2010 se sembraron en el Perú 258.364 ha, de las que el 17,32% corresponde a la producción de maíz amiláceo choclo (grano tierno) y 82,68% a maíz grano seco. De este último, el rendimiento promedio nacional fue de 1.337 kg/ha (Oficina de Información Agraria del Ministerio de Agricultura, OIA-MINAG 2009). El rendimiento del maíz amiláceo en las chacras maiceras de la región quechua es heterogéneo, dependiendo de una serie de factores como la ubicación de la chacra en el piso ecológico, la fertilidad del suelo, manejo del cultivo, riego, presencia oportuna de lluvias, etc. Así, se han descrito valores que oscilaron entre 1,623 t/ha y 12,021 t/ha en cinco explotaciones campesinas en Laraos (Lima), a 3,563 m.s.n.m. (Brunschwig 1986). En el valle de Yucay (Cuzco), a 2.853 m.s.n.m., la variedad Cuzco gigante produjo 10 t/ha de maíz grano (Grobman et al. 1961). En las chacras maiceras de los ayllus de Oyolo (Ayacucho), a 3,350 m.s.n.m., el rendimiento del maíz amiláceo varió de 3,50 a 7,5 t/ha de grano seco (Calderón 1987; Huauya et al. 2001). En las chacras maiceras de la comunidad de Allpas (Huancavelica), localizadas a 3,537 m.s.n.m, en condiciones de secano, el rendimiento osciló de 1,25 a 6,5 t/ha de grano seco (Arone et al. 2012).

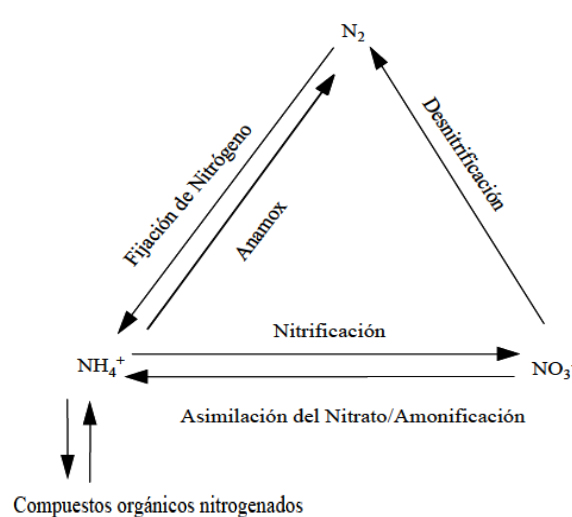
1.3. La asociación natural del maíz amiláceo con el trébol andino

En las chacras de la región Quechua del Perú, tanto las de riego como las de secano, algunos días después del segundo aporque, emerge, sin previa siembra, una leguminosa anual que los campesinos conocen como trébol andino (*Medicago polymorpha* L. syn. *Medicago hispida*, Gaertn) (Lesins y Lesins 1979). El género *Medicago* comprende 33 especies anuales (Lesins y Lesins 1979), de las que *M. hispida* es la especie con mayor rango de adaptación medioambiental (Piano y Pecetti 2010). Se trata de una especie de gran interés agronómico ya

que proporciona un forraje de alta calidad (Zhu et al. 1996; Shrestha et al. 1998; Issolah et al. 2011), previene la erosión y mejora la fertilidad del suelo (Lesins y Lesins 1979) y no genera competencia alguna con el desarrollo del maíz ya que aparece una vez pasado el periodo crítico de competencia con las malezas (Williams 2006). En la mayoría de las ocasiones, los campesinos no cosechan el trébol sino que lo dejan para alimento de su ganado. Durante este pastoreo, los animales aportan al suelo deyecciones sólidas y líquidas, lo que contribuye a la fertilidad de la chacra.

1.4. Ciclo del N: Fijación biológica del N₂

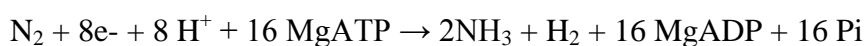
El nitrógeno (N) es, con la excepción del agua, el nutriente limitante más común en la práctica de la Agricultura. Es, además, un elemento esencial para todas las formas de vida ya que forma parte de moléculas orgánicas tan importantes como los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, etc. A pesar de su abundancia en la atmósfera como dinitrógeno



(N₂), su utilización no puede llevarse a cabo por la mayoría de los seres vivos, sino tan sólo por un grupo de microorganismos procariontes, denominados diazotrofos, que tienen la capacidad de reducirlo a amonio (Figura 1.1). Este proceso de reducción se conoce como fijación biológica del N₂ y se lleva a cabo por microorganismos diazotrofos tanto en vida libre como en simbiosis con plantas leguminosas y actinorrícicas

Figura 1.1. Ciclo del N

La enzima clave de la fijación de N₂ es la nitrogenasa que consta, típicamente, de una ferroproteína (Fe-proteína, nitrogenasa reductasa) y de una molibdoferroproteína (MoFe-proteína, nitrogenasa). Cuando en el medio no hay disponibilidad de molibdeno, algunas bacterias como *Azotobacter vinelandii* o *Rhodobacter capsulatus* inducen la síntesis de nitrogenasas alternativas que contienen vanadio o hierro en lugar de molibdeno (Dixon y Kahn 2004; Bellenger et al. 2008; Rubio y Ludden 2008). En condiciones óptimas, la reacción estequiométrica de reducción de N₂ la siguiente:



El mecanismo enzimático de actividad de la nitrogenasa requiere la reducción de la Fe-proteína por donadores de electrones como la ferredoxina o la flavodoxina, la transferencia de

electrones, dependiente de la hidrólisis de MgATP, a la molibdoferroproteína y, finalmente, la transferencia interna de electrones en la MoFe-proteína. Una parte importante del poder reductor que se utiliza para fijar N_2 se pierde en forma de hidrógeno (H_2) a causa de una reacción colateral e inevitable catalizada por la nitrogenasa, lo que representa una fuente de ineficiencia energética del proceso de fijación. Algunas bacterias poseen una enzima hidrogenasa (sistema Hup) capaz de oxidar el H_2 producido, lo que les permite recuperar parte del poder reductor utilizado en su síntesis. De esta manera se mejora la eficiencia energética del sistema de fijación de N_2 (Imperial et al. 2006; Annan et al. 2012).

La oxidación de amonio a nitrato (NO_3^-) se conoce como nitrificación (Figura 1.1) y la llevan a cabo las bacterias nitrificantes. En este proceso la enzima amonio monooxigenasa oxida el amonio a nitrito (NO_2^-) y la nitrito óxidoreductasa (nitrito oxidasa) convierte el nitrito en nitrato. Este nitrato puede convertirse de nuevo en amonio mediante su reducción, primero, a nitrito por la enzima nitrato reductasa y, luego, a amonio mediante la enzima nitrito reductasa, proceso al que se denomina amonificación o asimilación del nitrato (Figura 1.1). Finalmente, la desnitrificación es el proceso por el que el nitrato se convierte en N_2 , que vuelve de nuevo a la atmósfera, cerrándose así el ciclo del N en la biosfera (Figura 1.1).

Se estima que la cantidad total de N que se adiciona al suelo es de unos 275 millones de toneladas métricas al año, de los que 30 se deben a causa naturales, como descargas eléctricas o erupciones volcánicas, 70 proceden de la síntesis industrial debida a la producción de fertilizantes nitrogenados mediante el proceso Haber-Bosch, y 175 se producen mediante la fijación biológica del N_2 (de Felipe 2006; Galloway et al. 2008) Este último proceso, por tanto, es fundamental para la vida en nuestro planeta ya que repone el contenido total de N en la biosfera y compensa las pérdidas que ocurren por desnitrificación (Philippot et al. 2007).

1.5. Simbiosis fijadoras de N_2 en plantas leguminosas

Las plantas leguminosas y actinorrícicas son únicas en la naturaleza ya que son capaces de establecer simbiosis fijadores de N_2 con ciertas bacterias diazotrofas. Tales bacterias inducen en las raíces de sus plantas hospedadoras la formación de nódulos, órganos característicos de la simbiosis, donde las células vegetativas se transforman en bacteroides, células especializadas que sintetizan la enzima nitrogenasa y llevan a cabo la reducción de N_2 a amonio. La mayoría de estas bacterias diazotrofas forman nódulos en las raíces, aunque *Azorhizobium* los ocasiona tanto en las raíces como en los tallos de *Sesbania rostrata*, y

Phyllobacterium los forma en las hojas de las plantas de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae*.

El establecimiento de una simbiosis eficiente requiere una secuencia de etapas independientes que definen las llamadas propiedades simbióticas, que son el resultado de la expresión de características propias de la bacteria, de la planta hospedadora y de la asociación de ambas. Estas propiedades son a) especificidad, o capacidad de interactuar a nivel molecular específicamente de forma que la bacteria se adhiere a la raíz e induce en ella la diferenciación del primordio nodular; b) infectividad, o capacidad de formar un canal de infección, atravesar el córtex de la raíz y penetrar en el interior de las células radicales; y c) efectividad, o capacidad de transformarse en bacteroides y reducir el nitrógeno atmosférico a amonio en el nódulo (Morón et al. 2006; Oldroy y Downie 2008; Robledo et al. 2011). La asociación simbiótica entre planta y bacteria implica una complementación nutricional recíproca ya que mientras la planta recibe N₂ fijado en forma de amonio, la bacteria dispone de productos hidrocarbonados y aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno.

Hasta el año 2001 todas las bacterias implicadas en la formación de nódulos con plantas leguminosas se clasificaban como miembros del orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria, incluyendo especies de los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Graham 2008; Rivas et al. 2009, Velazquez et al. 2010), a las que se conoce con el nombre genérico de rizobios. Sin embargo, Sy et al. (2001) demostraron que *Crotalaria* forma nódulos al inocularse con una Alphaproteobacteria del género *Methylobacterium*. Desde entonces, la nodulación de leguminosas por Alphaproteobacterias que no fueran rizobios se ha demostrado en *Neptunia natans*, que es nodulada por *Devosia* spp. (Rivas et al. 2002), *Lupinus albus* por *Ochrobactrum lupini* (Trujillo et al 2005), *Trifolium repens* y *L. abus* por *Phyllobacterium trifolii* (Valverde et al. 2005), y *Lotononis* por *Microvirga* (Ardley et al. 2011).

También en 2001 se publicaron dos trabajos pioneros en mostrar que las Betaproteobacteria eran capaces de nodular leguminosas. Por una parte, Moulin et al. (2001) describieron dos cepas de *Burkholderia*, STM678 y STM815, aisladas de *Aspalathus carnosa* y *Machaerium lunatum*, respectivamente, a las que posteriormente se nombraron *B. tuberum* y *B. phymatum* (Vandamme et al. 2002). Por otra, Chen et al. (2001) describieron el asilamiento de nódulos de *Mimosa pudica* y *M. diplotricha* de *Ralstonia taiwanensis*, a la que se renombró como *Cupriavidus taiwanensis* (Vandamme y Coenye 2004). La confirmación de la formación de nódulos y la capacidad de fijar nitrógeno por Betaproteobacterias se obtuvo al inocular

Mimosa con cepas de *C. taiwanensis*, *B. nodosa* y *B. mimosarum* transformadas con el gen codificante de una proteína verde fluorescente (GFP) (Chen et al. 2003; 2005a, b). Estos experimentos de nodulación junto al análisis de las secuencias del gen *nodA* demostraron que la cepa STMS815 de *B. phymatum* era una verdadera bacteria simbiótica (Elliot et al. (2007a). Ya se ha establecido con claridad el predominio de *Burkholderia* como simbionte de *Mimosa* (Elliot et al. 2009, Bontemps et al. 2010, dos Reis et al. 2010, Angus y Hirsch 2010; Mishra et al. 2012). Hasta la fecha, al menos 8 especies de *Burkholderia* son capaces de nodular y fijar N₂ con diferentes especies de *Mimosa* (Gyaneshwar et al. 2011; Sheu et al. 2012; Avelar-Ferreira et al. 2012), aunque se ha aislado *Burkholderia* de otras leguminosas como *Abarema macademia* (Barret y Parker 2005), *Piptadenia* spp. (Jobson y Luckow 2007) y *Phaseolus vulgaris* (Talbi et al. 2010).

También se ha descrito que ciertas especies de las Gammaproteobacteria, incluyendo los géneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia* y *Pseudomonas*, se han aislado de nódulos de varias especies de *Hedysarum* y de *Robinia pseudoacacia* (Benhizia et al. 2004, Shiraishi et al. 2010). No obstante, su función en los nódulos no se ha definido con claridad.

La capacidad de la simbiosis leguminosa-proteobacteria para reducir N₂ permite que estas plantas sean, actualmente, la fuente proteica más importante para los países en desarrollo, la segunda fuente de alimentos a nivel mundial, y de gran relevancia como forrajeras y componente de piensos para alimento animal (Sprent 2009). Las leguminosas pueden desarrollarse en suelos deficientes en N, de escasa fertilidad, por lo que se utilizan como plantas pioneras en su recuperación, así como en procesos de revegetación y fitorrecuperación de suelos deteriorados. Por otra parte, el empleo de la simbiosis-leguminosa es una alternativa para disminuir la aplicación de fertilizantes nitrogenados, lo que redundaría en una disminución significativa tanto en términos económicos como de contaminación medioambiental.

El empleo de leguminosas en la rotación de cultivos es muy frecuente ya que se ha demostrado que mejoran las condiciones físicas del suelo y aumentan la materia orgánica y el contenido en N del suelo, lo que se aprovechará por los cultivos posteriores (Zhu et al. 1998; Sheaffer et al. 2001). Además, la cobertura foliar evita cambios bruscos de temperatura y conserva la humedad en el suelo al tiempo que disminuye la incidencia de germinación de malezas, la escorrentía y la erosión (De Haan et al. 1997). De aquí que, de manera tradicional, se empleen leguminosas en rotación de cultivos para mantener la fertilidad del suelo (Carpena et al. 2006; Rodiño et al. 2011).

Estas características de las leguminosas son desconocidas por las familias campesinas andinas, por lo que consideran al trébol andino como maleza, y acostumbran a retirarlo de las chacras. En la Costa, el control de plantas arvenses se realiza mediante el empleo de diversos herbicidas (Villarias 2000; Chávez y Guevara-Féfer 2003; Hanson y Schneider 2008; Muhammad et al. 2009).

1.6. La comunidad microbiana en el suelo

El suelo es un ente vivo, complejo y heterogéneo, cuya variedad se traduce en los diferentes microhábitats colonizados por microorganismos en estrecha asociación con las partículas del suelo y otros componentes del mismo (Foster 1988; Daniel 2005; Mocalli y Benedetti 2010). El suelo alberga la mayor riqueza en especies de hongos, protozoos, algas y bacterias (Anderson 1975; Usher et al. 1979; Giller 1996; Germida y Siciliano 2001; Buée et al. 2009; Sanon et al. 2009). Estas últimas son las más abundantes y diversas, posiblemente por ser capaces de crecer más rápidamente y poder utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y de nitrógeno. La actividad, ecología y dinámica de las poblaciones microbianas que forman la comunidad edáfica se afectan por las características físico-químicas del suelo y por los propios organismos (Stotzky 1989; Hinsinger et al. 2009) (Tabla 1.2).

En volumen, la fase sólida del suelo ocupa aproximadamente el 50% del total, mientras que las fases gaseosa y líquida se reparten el resto del espacio disponible (Jordan 2005). La fase sólida está formada por partículas de arena, limo y arcilla de diferentes tamaños, por la materia orgánica procedente de residuos vegetales, animales y microorganismos en diferentes fases de descomposición, y por la microbiota viva (van Elsas et al. 1997; Dennis et al. 2008). La fase acuosa, en la que se encuentran las sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven como nutrientes o inhibidores de los microorganismos, está disuelta y se dispone de forma discontinua en el suelo, excepto cuando está saturado. El espacio que no está ocupado por la fase acuosa, se rellena con aire u otros gases (O_2 , CO_2 , CH_4 , CO , NO_x), ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, aldehídos y/o compuestos aromáticos, siendo unos desplazados por otros, afectando a la composición y actividad de los microorganismos. De hecho, las concentraciones de O_2 y CO_2 varían de un suelo a otro y de una porción de suelo a otra, dependiendo de la temperatura y humedad (Yamaguchi et al. 1967, Hinsinger et al. 2009), contenido en materia orgánica (Abrosimova y Revut 1964, Dennis et al. 2010), profundidad del suelo (Wood et al. 1993) y tipo de cultivo (Buyanovsky y Wagner 1983).

La diversidad de la comunidad bacteriana edáfica es enorme ya que un solo gramo de suelo puede contener entre 1×10^3 y 1×10^6 especies únicas de bacterias (Torsvik et al. 2002, Gans et al. 2005, Tringe et al. 2005, Fierer et al. 2007). El estudio de esta diversidad es un gran desafío para la Microbiología actual ya que nuestro conocimiento de la vida microbiana y del papel que los microbios juegan en el suelo es todavía poco conocido.

Tabla 1.2. Factores que afectan a la comunidad bacteriana edáfica (Stotzky 1989)

Factores	Parámetros
Físico-químicos	Temperatura
	Presión
	Composición atmosférica
	Radiación electromagnética
	pH
	Potencial rédox
Físicos	Superficie
	Disponibilidad hídrica
	Relaciones espaciales
Químicos	Composición iónica
	Conductividad
Biológicos y nutricionales	Carbono y nitrógeno
	Nutrientes minerales
	Factores de crecimiento
	Genética de los microorganismos
	Interacciones entre los microorganismos

De hecho, empleando métodos dependientes de cultivos sólo se ha descrito el 0,001-0,1% del total de los microorganismos en el agua de mar, el 0,25% de agua dulce, un 0,25% de los sedimentos y el 0,3% de los microorganismos del suelo (Amann et al. 1995, Singh et al. 2008). Esto implica que una gran mayoría de las bacterias no son cultivables y, consecuentemente, desconocidas para el ser humano. Es posible que ello se deba a que el desconocimiento de los requerimientos nutricionales y fisiológicos para su crecimiento no

permita su cultivo en los medios habituales de laboratorio (Ovreas y Torsvik 1998, Rondon 1999, Peix et al. 2011).

1.7. Importancia de los microorganismos del suelo

Las bacterias y los hongos son fundamentales para el buen funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos y para la transferencia de energía a los niveles superiores de la cadena trófica (Figura 1.2). Tanto en suelos naturales como agrícolas, los microorganismos son indispensables para el mantenimiento de su función ya que están implicados en los ciclos del C, N, P y S, e intervienen en procesos claves como la formación de la estructura del suelo, descomposición de la materia orgánica, eliminación de toxinas, etc. (van Elsas y Trevors 1997).

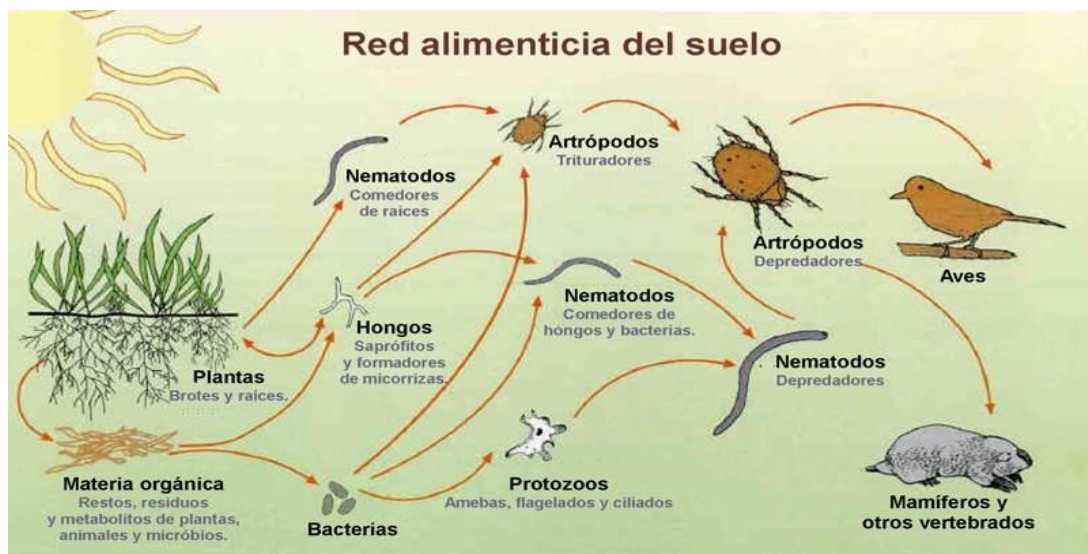


Figura 1.2. Red alimenticia del suelo.

Fuente: http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil_biology/images/A-3.jpg

Además, los microorganismos juegan un papel crucial en la defensa de enfermedades y en la promoción del crecimiento de las plantas, así como en cambios en la vegetación (Doran et al. 1996), por lo que tienen un papel crítico en el mantenimiento de la calidad del suelo en los sistemas agrícolas (Kennedy et al. 1995). Las características microbianas del suelo pueden indicar cambios en la disponibilidad de recursos, estructura del suelo o contaminación y puede representar una clave importante para entender el impacto de factores ambientales y antropogénicos (DeLong y Pace 2001; Tiedje et al. 1999; Pankhurst et al. 1996).

La diversidad de sus microorganismos representa la capacidad de un suelo para afrontar las alteraciones que puedan producirse (Bardgett 2002; Johnsen et al. 2001; Kennedy 1999). La elevada densidad y diversidad que caracteriza a la microbiota del suelo hacen que se adapte rápidamente a cambios en las condiciones ambientales por medio de ajustes en 1) las tasas de actividad, 2) biomasa, y 3) estructura de la comunidad, tres parámetros que deben considerarse para evaluar la calidad de un suelo (Schloter et al. 2003).

1.8. La rizosfera

El término rizosfera se utilizó a principios del siglo XX por el agrónomo alemán Hiltner para referirse, por primera vez, al efecto de las raíces de las plantas sobre el suelo circundante en términos de mayor actividad microbiana debida a la liberación de materia orgánica por las raíces. En el último decenio del pasado siglo XX, este efecto pasó a considerarse como un ecosistema (Lynch 1990).

Se puede definir la rizosfera como la zona donde la raíz de la planta puede afectar la biología y la química del suelo (Lynch 1990; Hinsinger et al. 2005; Bais et al. 2006). Aunque la extensión física de la rizosfera no es fácil de definir por la compleja interfaz suelo-raíz, se considera que la rizosfera se extiende sólo unos pocos milímetros de la superficie de la raíz (Bertin et al. 2003; Gregorio 2006). En algunos casos no hay un límite definido entre la rizosfera y la mayor parte del suelo debido a la extensión de las hifas de raíces colonizadas por hongos del suelo (Linderman 1988; Molina et al. 1992; Gobat et al. 2004).

La rizosfera puede dividirse en tres áreas (Dommergues y Krupa 1978; Lynch 1987; Morgan et al. 2005):

- 1) La ectorizosfera (rizosfera externa), que comprende la zona del suelo alrededor de las raíces de las plantas y las poblaciones de los microorganismos que la habita.
- 2) La rizoplana, formada por la superficie radicular y los microorganismos que viven en ella.
- 3) La endorizosfera (o rizosfera interna), formada por la corteza radical de la raíz invadida y colonizada por microorganismos (infección del hospedador no patogénica).

La densidad bacteriana en la rizosfera es, generalmente, mucho mayor que la densidad bacteriana del resto del suelo (Lynch 1990), lo que se debe a la elevada concentración de nutrientes que aporta la planta en esa zona y que favorecen la actividad y el crecimiento de las bacterias (Turner y Frantz 1985, Cesco et al. 2010; Bais et al. 2006; Dennis et al. 2010). En contraste, el crecimiento microbiano en el suelo no rizosférico está limitado por la escasa

disponibilidad de fuentes de carbono orgánico y por su lenta metabolización (Højberg et al. 1996; Dennis et al. 2010). Además, la ausencia de entrada externa de materia orgánica hace difícil mantener una biomasa microbiana constante (De Nobili et al. 2001).

Se estima que las plantas liberan a través de sus exudados radicales entre un 20% y un 48% de sus productos fotosintéticos, entre ellos azúcares solubles, aminoácidos, hormonas, vitaminas, ácidos orgánicos, etc. (Uren 2001; Buchenauer 1998; Bottner et al. 1999; Marcial Gomes et al. 2003; Mougél et al. 2006; Houlden et al. 2008). Los exudados de bajo peso molecular que se liberan (ver más abajo) son factores clave que influyen en la diversidad y las tasas de crecimiento de los microorganismos de la rizosfera y su efecto depende de la distancia a la que pueden difundirse fuera de la rizoplanea (Gupta y Mukerji 2002).

La composición cualitativa y cuantitativa de los exudados de las raíces se altera por factores ambientales, incluyendo pH, tipo de suelo, estado de oxigenación, intensidad luminosa, temperatura del suelo, disponibilidad de nutrientes y presencia de microorganismos (Singh y Mukerji 2006). La especie de planta, su ciclo de crecimiento y tipo de raíz también influyen en la producción de exudados, y éstos, a su vez, ejercen una fuerte presión selectiva sobre la composición de la comunidad microbiana de la rizosfera (Hartmann et al. 2009; Berg y Smalla 2009) (Figura 1.3).

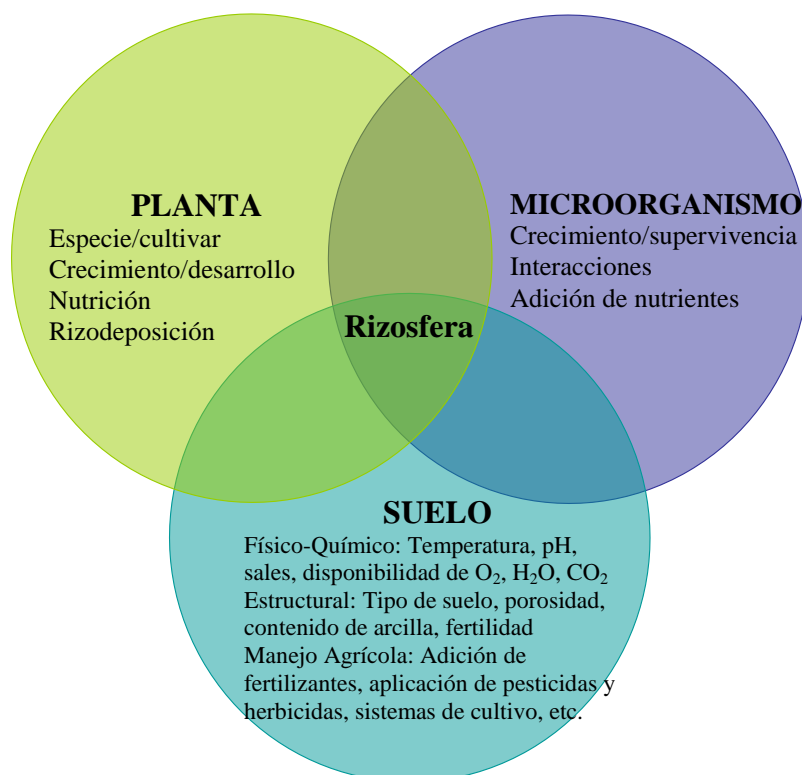


Figura 1.3. Factores que influyen en la interacción rizosférica (Brimecombe et al. 2007).

Los compuestos orgánicos liberados por las raíces (exudados o rizodeposiciones) se pueden dividir en cinco grupos, dependiendo de su forma de liberación y tamaño:

1. Exudados hidrosolubles: Comprenden sustancias de bajo peso molecular que se liberan sin la mediación de ninguna actividad metabólica. Su exudación se lleva a cabo a favor de un gradiente de concentración (Bowen y Rovira 1991; Dennis et al. 2010).
2. Secreciones: Incluyen sustancias de mayor peso molecular que requieren de un proceso metabólico para su liberación. Pueden liberarse en contra de gradientes de potencial químico o electroquímico (Hale et al. 1978; Dennis et al. 2010).
3. Lisados: Proviene de la autólisis celular y comprenden el contenido celular (Whipps 1990). Las raíces muertas aportan compuestos orgánicos y suministran nutrientes al suelo que influyen decisivamente sobre la biomasa (Joslin y Henderson 1987; Whipps 1990; Hodge et al. 1998), sobre el mantenimiento de la materia orgánica del suelo y sobre la dinámica del ciclo del N (McClaugherty et al. 1984; Hodge et al. 1998).
4. Gases: Como etileno, dióxido de carbono y cianhídrico (Rovira 1956, 1969 y 1973) considera estos gases como parte de los exudados de bajo peso molecular.
5. Mucílagos: Cubren las raíces de muchas plantas y están compuestos principalmente por polisacáridos y ácidos poligalacturónicos de alto peso molecular (Marschner 1986; Watt et al. 1993).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en la rizosfera, y se les suele denominar con el nombre de rizobacterias. En presencia de una microbiota nativa que compite con ellas, las rizobacterias son capaces de multiplicarse y colonizar los nichos ecológicos de la raíz durante las diversas etapas del crecimiento de la planta (Antoun y Kloepper 2001). La presencia de rizobacterias en la rizosfera puede tener un efecto neutro, perjudicial o beneficioso sobre el crecimiento vegetal. Mientras que las primeras no suelen tener efecto alguno, las perjudiciales pueden afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las rizobacterias que ejercen un efecto beneficioso sobre la planta se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, a las que se conoce con el nombre de PGPRs por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Kloepper y Schroth 1978).

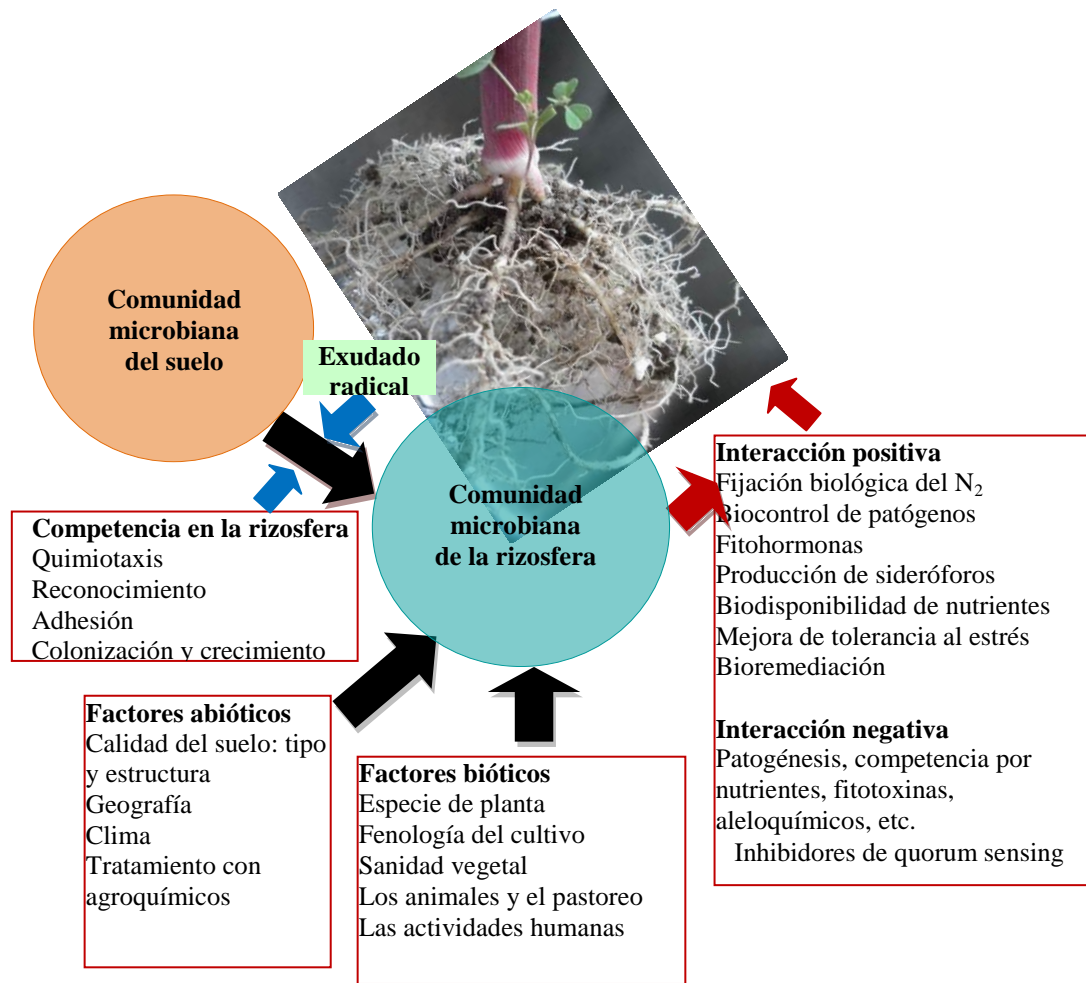


Figura 1.4. Interacción planta-microorganismo y los factores que influyen en la comunidad microbiana de la rizosfera (Bais et al. 2006; Berg y Smalla 2009).

Las PGPRs facilitan el crecimiento y desarrollo de las plantas de forma directa mediante la provisión de amonio procedente de la fijación de N₂, producción de fitohormonas y sideróforos, solubilización de fosfato, etc. Indirectamente, pueden prevenir el desarrollo de fitopatógenos (control biológico) y, por tanto, fomentar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Glick y Bashan 1997). Además, promueven las tasas de germinación, el crecimiento de la raíz, el área foliar, el contenido en clorofila, la actividad hidráulica, tolerancia a la sequía, aumento del peso de brotes y raíces y retrasó en la senescencia foliar (Lucy et al. 2004) (Figura 1.5).

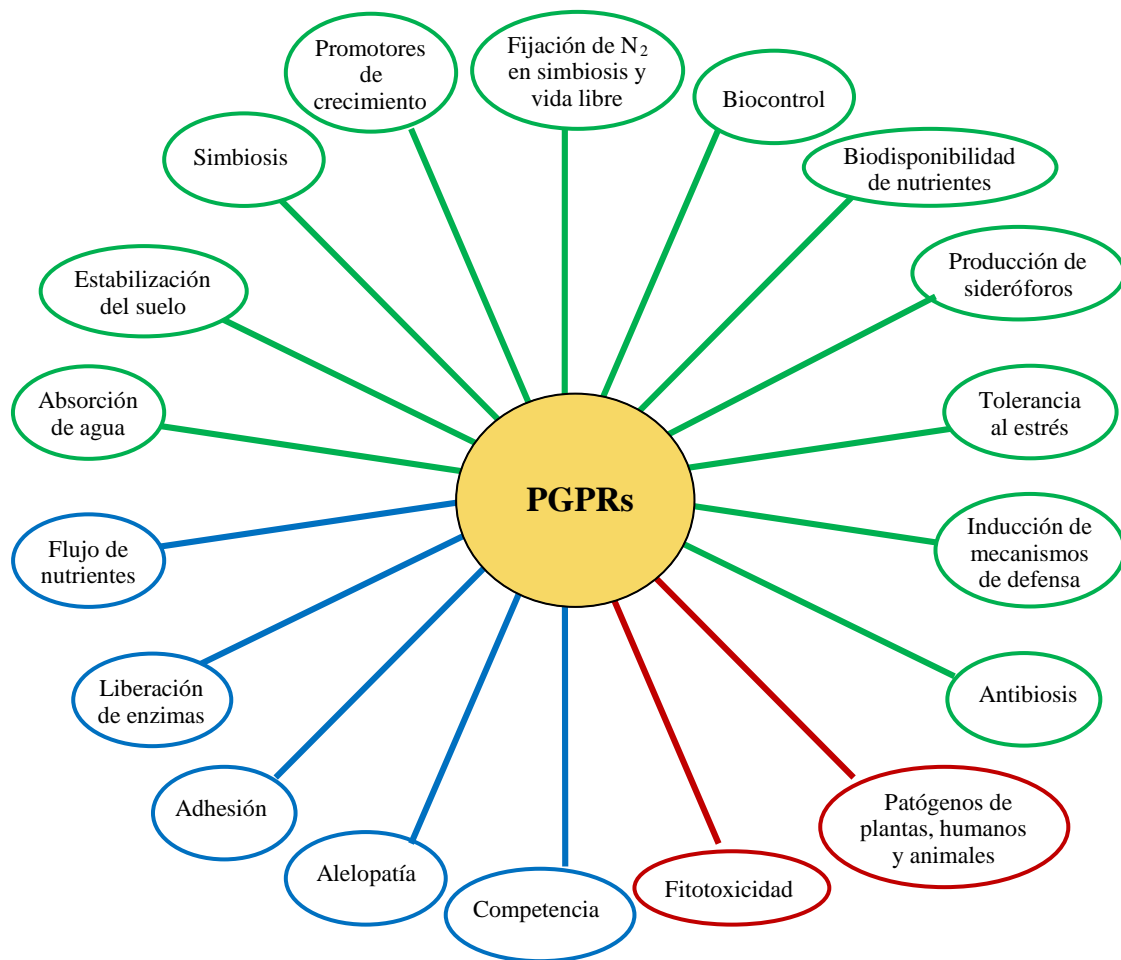


Figura 1.5. Actividades PGPR en la rizosfera de las plantas. Las marcadas con el color verde corresponden a las interacciones positivas planta-bacteria, las rojas a las interacciones negativas y las azules a las interacciones neutras. (Lynch 1990; Berg et al. 2005; Weyens et al. 2010).

1.9. Bacterias endofitas

Tomada literalmente, la palabra endofito significa "dentro de la planta" (*endon*, en griego, dentro de; *phyton*, planta). Según Bacon y White (2000), los endofitos son microorganismos que colonizan tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta. De este modo, las bacterias endofitas se consideran aquellas aisladas de tejidos de plantas vivas desinfectadas superficialmente, o extraído de tejido interno de la planta, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Kloepper et al. 1992; Hallmann et al. 1997). Estas bacterias se encuentran principalmente en

los espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares, sin causar síntomas de enfermedad (Hurek et al. 1994; Bell et al. 1995).

Las bacterias endofitas pueden proceder de las semillas (McInory y Kloepper 1995), material vegetativo de siembra (Sturz 1995), tubérculos (Trevet y Hollis 1948), raíces (Philipson y Blair 1957), tallos y hojas (Henning y Villforth 1940), frutos (Samish et al. 1961; Sharrock et al. 1991), suelo rizosférico (Patriquin et al. 1983) y la filosfera (Beattie y Lindow, 1995). Con la excepción de las bacterias transmitidas por semillas (McInory y Kloepper 1995), que ya están dentro de la planta, los potenciales endofitos encuentran a su hospedador por quimiotaxis, electrotaxis, o encuentro accidental, y deben colonizar primero la superficie de la raíz antes de penetrar en la planta. En general, el ingreso al interior de la planta se realiza a través de aberturas naturales como los estomas de la hoja o las lenticelas del tallo (Kluepfel 1993), las flores (Sharrock et al. 1991), heridas, uniones epidermales, puntos de emergencia de las raíces laterales o por las aberturas producidas durante la emergencia de las raíces. Las heridas de las plantas, producidas sea por factores bióticos o abióticos, son probablemente un factor importante para la entrada de las bacterias endofitas. Las heridas en las raíces, además de proporcionar una vía de entrada, también crean condiciones favorables al liberar los exudados radicales al exterior, los que sirven como fuente de energía para las bacterias (Hallmann et al. 1997).

Se han descrito diversos tipos de endofitos (Figura 1.6). Los endofitos por casualidad, también llamados endofitos pasajeros, colonizan a través de las heridas naturales. Los endofitos oportunistas colonizan la rizoplanea y, posteriormente, invaden los tejidos internos de la planta a través de grietas formadas en los lugares de emergencia de las raíces laterales y de los ápices de las raíces. Similar a los endofitos pasajeros, los oportunistas se limitan a invadir los tejidos de la corteza de la raíz. Los endofitos competentes invaden el tejido vegetal, se adaptan al medio ambiente de la planta, son capaces de colonizar diversas partes de la misma y, en todos los casos, se mantienen en equilibrio armónico con la planta hospedadora, incluso cuando están presentes en alta densidad (Hardoim et al. 2008).

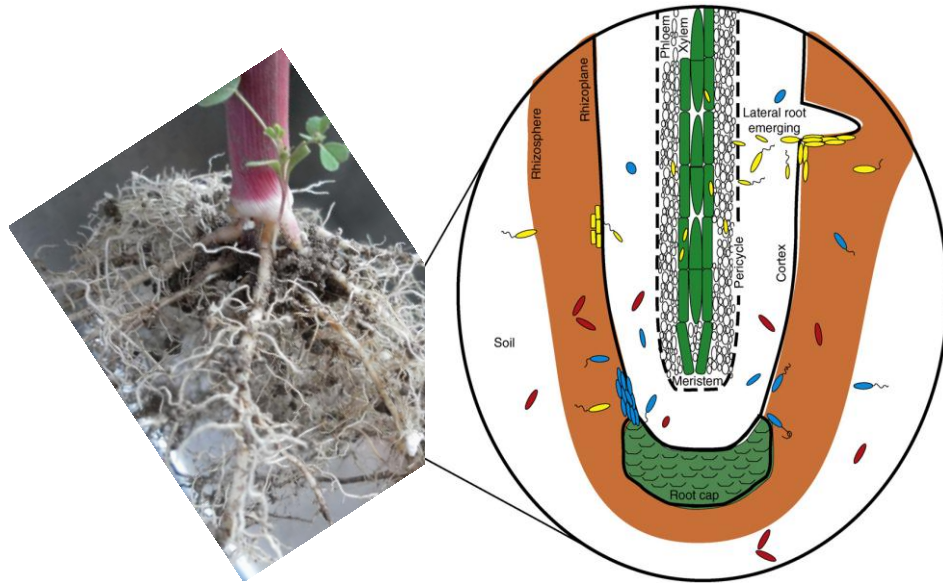


Figura 1.6. Tipos de endofitos. Color rojo: Endofitos por casualidad, que colonizan a través de las heridas naturales. Color azul: Endofitos oportunistas, que colonizan la rizoplane. Color amarillo: Endofitos competentes, que invaden el tejido vegetal (Hardoim et al. 2008).

La densidad de las poblaciones de bacterias endofitas es muy variable y depende de las especies bacterianas, la planta hospedera y su estado de crecimiento y de las condiciones ambientales (Hallmann et al. 1997; Ladygina y Hedlund 2010). En general, las poblaciones de bacterias son más abundantes en las raíces que en los tallos y hojas (Cordero et al. 1996; Hallmann y Berg 2006). Las poblaciones de endofitos presentes en un mismo tejido varían con el tipo de planta. Kobayashi y Palumbo (2000) encontraron variaciones entre 10^2 y 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/g de raíz en alfalfa, maíz dulce, remolacha, calabaza, algodón y papa.

1.10. Diversidad bacteriana del suelo y sistemas de estudio

Como ya se ha indicado, la diversidad de las poblaciones bacterianas edáficas es enorme, y un solo gramo de suelo puede contener entre 1×10^3 y 1×10^6 especies únicas de bacterias (Torsvik et al. 2002; Gans et al. 2005; Tringe et al. 2005; Fierer et al. 2007).

1.10.1. Estudio de la diversidad bacteriana basada en métodos dependientes de cultivo

Es el método tradicional para estudiar la diversidad bacteriana. Se basa en el empleo de diversos medios de laboratorio para el cultivo y aislamiento de bacterias (van Elsas et al. 1998). Se ha formulado una amplia variedad de medios de cultivo de manera que se pueda obtener el mayor número posible de diferentes unidades formadoras de colonias (UFCs). Para un hábitat determinado, sin embargo, se ha estimado que el número de bacterias que pueden aislarse de muestras medioambientales no supera el 10% de las que, en realidad, pueden ocurrir en ese hábitat (Torsvik y Øvreås 2002; Singh et al. 2008; Peix et al. 2011). Estas limitaciones se han asociado a la dificultad de reproducir, en condiciones de laboratorio, los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas que ocurren en condiciones naturales. La posible toxicidad del medio, la auxotrofia producida por pérdida de nutrientes, supresión de las bacterias de lento crecimiento por aquellas de crecimiento más rápido, dificultad de reproducción en condiciones de laboratorio por la ausencia de interacciones inter e intraespecíficas que ocurren en la naturaleza también se han considerado como factores que limitan el cultivo bacteriano en medios de laboratorio (Schink, 2002; Water y Bassler, 2005; Stams et al. 2006). En condiciones naturales, las comunidades bacterianas han evolucionado a lo largo de millones de años de selección natural y han establecido, a través de múltiples interacciones, diversos consorcios microbianos difíciles de simular de manera artificial (Keller y Zengler 2004; Giovannoni et al. 2007). Una vez aisladas las bacterias en condiciones de laboratorio, su identificación y clasificación taxonómica se llevan a cabo empleando diversas técnicas, tanto fenotípicas como genotípicas y, finalmente, se procede a su almacenamiento y conservación (Morales-García et al. 2010; Winters y Winn 2010).

A pesar de sus limitaciones, el empleo de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias es una herramienta útil y complementaria de los métodos independiente de cultivo para estudios de fisiología, bioquímica y genética microbiana (Ben-Dov et al. 2009). Estos métodos sirven también para confirmar los datos derivados de la observación de procesos ecológicos y para valorar hipótesis originadas a partir de estudios de genómica y metagenómica (Giovannoni et al. 2007).

1.10.2. Estudio de la diversidad bacteriana basada en métodos independientes de cultivo

La reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, Polymerase Chain Reaction), es una técnica de Biología Molecular desarrollada por K. B. Mullis entre 1983 y 1986 cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento determinado de ADN partiendo, en teoría, de una única copia de ese ADN (Mullis 1990, 1998). Por su interés en Medicina, Biología, Biotecnología, Ciencias Forenses, etc., K. B. Mullis recibió el premio Nóbel de Química en 1993. Entre sus múltiples aplicaciones destacan la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas usada en técnicas forenses y tests de paternidad, y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas. Los grandes avances científicos, no obstante, ocurren, en la mayoría de las ocasiones, gracias al desarrollo de la tecnología que las hace posibles. Este es el caso del termociclador, indispensable para que pueda llevarse a cabo la PCR. El secuenciador de ADN, el empleo de polimerasas resistentes a elevadas temperaturas, así como de programas informáticos que permiten la lectura y manejo de los datos que proporciona la secuenciación, son fundamentales para el abundante empleo que se hace actualmente de la PCR. De enorme importancia para la realización de esta técnica es el uso de cebadores (primers), que son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región complementaria al ADN molde que se desea amplificar e inician la reacción de extensión del ADN por la ADN polimerasa.

1.10.3. Marcador filogenético universal: El gen 16S rRNA

La subunidad pequeña que constituye los ribosomas (SSU, small subunit) está codificada por el gen 16S rRNA (*rrn16S*), un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pares de bases (pb). Este gen posee una serie de características que lo hace ideal para su empleo en identificación y filogenia bacteriana, entre ellas: 1) está conservado en todas las bacterias, y tiene la misma función en todas ellas; 2) diferentes regiones de la molécula de ADN presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferentes niveles de resolución; 3) el gen se transfiere de manera vertical; y 4) la longitud de su secuencia permite su fácil manejo “*in silico*” (Woese y Fox 1977; Woese 1987; Tringe y Hugenholtz 2008; Amaral-Zettlera et al. 2008). El depósito de millones de secuencias de ADN de los genes 16S rRNA en las Bases de Datos permite el análisis comparativo de este tipo de secuencias. Weisburg et al. (1991) fueron pioneros en diseñar un par de cebadores capaces de amplificar casi en la secuencia completa del gen 16S rRNA de un amplio número de bacterias filogenéticamente separadas. Actualmente, hay una amplia colección de

cebadores que permiten la amplificación de distintos fragmentos del ADN del gen 16S rADN (Baker 1993; Guo y Milewicz 2003; Nossa et al. 2010; Kumar et al 2011).

El National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) es parte de la National Library of Medicine de los Estados Unidos, una rama de los National Institutes of Health (NIH). Está localizado en Bethesda (Maryland) y se fundó en 1988 con la misión de ser una importante fuente de información de Biología Molecular. GenBank es la base de datos de secuencias genéticas del NIH, una colección de disponibilidad pública de secuencias de ADN. Realiza una puesta al día cada dos meses. Todas las bases de datos del NCBI están disponibles en Internet de manera gratuita, y son accesibles usando el buscador Entrez. GenBank es parte del International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que está integrado por la base de datos de ADN de Japón (ADN DataBank of Japan, DDBJ), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory, EMBL), y el GenBank del European Bioinformatics Institute (EBI, www.ebi.ac.uk), un instituto de investigación académica ubicado en el Wellcome Trust Genome Campus, en Hinxton, cerca de Cambridge (UK), que es parte del EMBL. Estas organizaciones intercambian datos diariamente. GenBank y sus colaboradores reciben secuencias génicas producidas en laboratorios de todo el mundo, procedentes de más de 100.000 organismos distintos. GenBank continúa creciendo a ritmo exponencial, doblando la cantidad de información contenida cada 10 meses.

Además del gen *rrn16S*, el operón *rrn* está constituido por otros dos genes, *rrn23S* y *rrn5S* que codifican las subunidades 23S y 5S de los ribosomas, respectivamente. De forma similar al gen *rrn16S*, el *rrn23S* posee regiones conservadas que pueden utilizarse para identificación de los procariontes (Hunt et al. 2006). El análisis del ADN intergénico entre los genes *rrn16S* y *rrn23S* (Internal Transcribed Spacer, ITS) se utiliza ampliamente en taxonomía y filogenia molecular debido a su elevado grado de variación incluso entre especies relacionadas, quizás debido a la escasa presión evolutiva que se ha ejercido sobre sus secuencias no funcionales. Puesto que los ITS presentan una elevada heterogeneidad en tamaño y en secuencia su análisis constituye una técnica de alta resolución que permite asignar filogenéticamente a los miembros de una comunidad o población bacteriana a nivel de subespecie (Peix et al. 2011)

A partir del ADN aislado de muestras medioambientales se han desarrollado una serie de técnicas moleculares para la identificación de microorganismos y estudios de biodiversidad. Entre ellas, la electroforesis en geles desnaturalizantes (DGGE) (Muyzer et al. 1993) o de

gradiente de temperatura (TGGE) (Muyzer y Smalla, 1998), el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), y del polimorfismo de fragmento terminal (T-RFLP) (Liu et al. 1997) se han utilizado en numerosos estudios de biodiversidad. Otra metodología, el análisis del polimorfismo de la conformación de las cadenas sencillas de ADN (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP (Schwieger y Tebbe 1998) de un gen determinado amplificado mediante PCR proporciona excelentes resultados para el análisis del ADN aislado a partir de muestras medioambientales (Smalla et al. 2007). Esta técnica, al menos en teoría, permite discriminar entre secuencias con alteraciones en una sola base de ADN. La sensibilidad del SSCP aumenta cuando se emplea MDE^T (Mutation Detection Enhancement), un gel preparado a partir de una matriz de poliacrilamida (Sentinelli et al. 2000), que permite separar ADNs de acuerdo a su conformación y tamaño (Soto y Sukumar 1992), lo que aumenta la sensibilidad en comparación con los geles normales de poliacrilamida. El empleo de geles con formato de pequeño tamaño facilita, además, la manipulación para su posterior tinción.

El estudio de una comunidad funcional de microorganismos mediante TGGE, DGGE, RFLP, T-RFLP y SSCP presenta una seria limitación ya que la presencia de un gen en una muestra determinada proporciona evidencia de su existencia, pero no informa de la ocurrencia de la correspondiente actividad del producto que codifica ni permite determinar la abundancia relativa de cada población en la comunidad. Por tanto, estudiar la biodiversidad de una comunidad funcional es sólo de valor limitado si los resultados no pueden cuantificarse. Para ello, se ha desarrollado la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) que emplea sondas fluorescentes (Nitsche et al. 1999) o colorantes (Morrison et al. 1999) para cuantificar el número de copias del ADN de un gen presente en muestras medioambientales. Esta técnica es tanto de una gran especificidad, necesaria para la discriminación entre diferentes miembros de una familia génica, y sensibilidad, lo que se requiere para la identificación de transcritos poco abundantes.

1.11. Metagenómica

La PCR ha cambiado radicalmente nuestra comprensión del mundo microbiano ya que ha permitido el análisis de las poblaciones bacterianas a partir del ADN extraído de muestras medioambientales, sin necesidad de aislarlas ni cultivarlas. El término metagenómica se utilizó por primera vez en el trabajo publicado por Handlesman et al. (1998) para referirse a una metodología que pretendía analizar una colección de genes secuenciados de una muestra ambiental como si se tratara de un único genoma. Posteriormente, Handelsman (2004) y

Riesenfeld et al. (2004) definieron el metagenoma como todo el ADN que se puede encontrar en una muestra medioambiental sea cual sea el ecosistema de que se trate. Más tarde, Chen y Pachter (2005) definieron la metagenómica como la aplicación de técnicas genómicas modernas para el estudio directo de comunidades de microorganismos en su entorno natural, evitando la necesidad de aislar y cultivar cada una de las especies que componen la comunidad.

Puesto que la biodiversidad microbiana es fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas, existe la necesidad de entender la variabilidad en la estructura y en las funciones de la comunidad microbiana en respuesta a los factores medioambientales que puedan modificarla. Para responder a estas cuestiones es necesario el desarrollo de técnicas que permitan la secuenciación económica y el análisis rápido y reproducible de múltiples secuencias de ADN procedentes de las muestras medioambientales. Esto ha sido posible por la aparición de las nuevas tecnologías que permiten reducir el precio de secuenciar el ADN a costes inferiores a aquellos que usan tecnología de secuenciación basada en el método de Sanger (Fore et al. 2006; Hall 2007; Schuster 2008; Stein 2008).

El gen 16S rRNA es el marcador molecular más utilizado en estudios de metagenómica para identificación de los microorganismos que pueden ocupar un ambiente determinado. Aunque después de su amplificación mediante PCR es posible la secuenciación directa de los productos de amplificación, se puede llevar a cabo la construcción de librerías genómicas mediante la inserción del ADN amplificado en vectores de clonación tales como pGEM-T Easy (Promega), TOPO TA y pCR-2.1 TOPO (Life Technologies). Aunque la obtención de librerías genómicas es un método adecuado para estudios de biodiversidad, consume tiempo y puede resultar caro. La secuenciación posterior del ADN clonado resultaría en la construcción de librerías génicas que darían información sobre la identidad de los fragmentos de ADN amplificados y permitiría el análisis filogenético detallado de tales genes.

Un problema que presenta el estudio del metagenoma es el del aislamiento del ADN de las muestras medioambientales. Ello se debe a la existencia de compuestos que puedan inhibir la hibridación de los cebadores al ADN molde, la actividad de la polimerasa, etc. Entre ellos, los ácidos húmicos, metales pesados y nucleasas se deben eliminar durante el proceso de aislamiento y purificación. Para ello, se han desarrollado diversos protocolos que permiten la obtención de ADN empleando, en la mayoría de los casos, kits comerciales. La utilización de polimerasas que minimicen los fallos en la lectura del ADN o que sólo amplifiquen cuando se activan a elevadas temperaturas es recomendable.

La metagenómica ha permitido conocer el metagenoma de muestras medioambientales tales como diversos ambientes marinos (Sogin et al. 2006; Jensen y Lauro 2008), áreas mineras (Edwards et al. 2006), los endofitos de papa (Manter et al. 2010), suelos forestales (Uroz et al. 2010) y la rizosfera de maíz (Pereira et al. 2011). También ha sido posible conocer el metagenoma de *Buchnera*, un endosimbionte de áfidos (Pérez-Brocal et al. 2006) y de las bacterias intestinales (Gill et al. 2006) y de la dentadura (Rudney et al. 2010) humana.

En relación con el sector agrícola, la metagenómica ha permitido aclarar cómo, a pesar de la presencia de un patógeno en el suelo, no se desarrolla la enfermedad que ocasiona. Así se ha acuñado el concepto de suelo supresor, que se define como aquel que no permite el progreso de la enfermedad por la presencia de microorganismos beneficiosos que anulan el efecto del patógeno (Steinberg 2006; Van Elsas et al. 2008). Este efecto puede deberse a la variedad de compuestos inhibitorios del crecimiento, antibióticos, etc. que sintetizan los microorganismos del suelo (Van Elsas et al. 2008).

1.12. Pirosecuenciación

Una limitación de la metagenómica es el número de secuencias de ADN que pueden obtenerse de un gen determinado a partir del ADN medioambiental, por ejemplo del 16S rRNA que, como ya se ha indicado, es el más habitual para estudios de identificación y de biodiversidad. Las curvas de rarefacción permiten conocer de manera estadística el número de secuencias que deben obtenerse para determinar si ese número define, de manera significativa, la biodiversidad bacteriana del ambiente en estudio.

A pesar de los grandes logros obtenidos mediante el método de Sanger y su imprescindible papel durante la era genómica, en los últimos años se ha visto relevado por los procedimientos de nueva generación denominados, en general, NGS (Next Generation Sequencing), desarrollados a partir de 2005. Estas nuevas tecnologías permiten la lectura más barata y eficiente de miles de secuencias de ADN, si bien los fragmentos (reads) que se obtiene son de menor tamaño. Las secuencias obtenidas requieren el empleo de potentes herramientas informáticas para su ensamblaje.

Un elemento clave de estas nuevas tecnologías es la pirosecuenciación, una técnica de secuenciación masiva de ADN que desarrollaron P. Nyrén y M. Ronaghi en los años 90 (Ronaghi et al. 1996 1998, 2001; Nyrén 2001). Está basada en la secuenciación por síntesis, acoplando la síntesis de ADN a una reacción quimioluminiscente, lo que permite una rápida determinación de secuencias en tiempo real.

1.12.1. Preparación de la librería de ADN

Consiste en la unión de pequeños fragmentos de ADN (300 a 500 pb) a unos adaptadores, A y B, que se ligan en ambos extremos. Para fragmentos de ADN de gran tamaño molecular es necesario el fraccionamiento previo del ADN. Estos adaptadores proporcionan las secuencias de hibridación para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería. El adaptador B está biotilado en su extremo 5', lo que permite la inmovilización de la librería mediante las perlas recubiertas de estreptoavidina. Después de la reparación de las mellas, las hebras no biotiladas se separan de las perlas y se usan como librería molde de ADN de hebra sencilla (sstADN). La librería sstADN se analiza para determinar su calidad y mediante titulación se determina la proporción óptima moléculas de ADN:perlas necesaria para la PCR en emulsión (emPCR) (Figura 1.7).

La librería sstADN se inmoviliza en las perlas. Cada perla contiene una única molécula de sstADN de la librería. La perla unida a la librería se emulsiona con los reactivos de amplificación en una micela de agua y aceite. Cada perla queda englobada en su propio microreactor dentro del cual ocurre la amplificación mediante PCR. El resultado será una perla inmovilizada conteniendo fragmentos de ADN amplificados clonalmente (Brockman et al. 2008; Zhang et al. 2011) (Figura 1.7). Las perlas unidas a los fragmentos de la librería sstADN se añaden al ADN Bead Incubation Mix (contiene ADN polimerasa) y se distribuyen en capas dentro de la placa junto con unas perlas enzimáticas que contienen la luciferasa y la sulfurilasa. La capa de perlas enzimáticas asegura que las perlas con ADN permanecen en el interior del pocillo durante la reacción de secuenciación. Este proceso maximiza el número de pocillos que contienen una única perla con ADN amplificado evitando que haya más de una perla unida a sstADN por pocillo. Cuando la placa está correctamente cargada se coloca en el equipo donde los reactivos de secuenciación (tampones y nucleótidos) fluirán a través de los pocillos de la placa. Durante el flujo de nucleótidos, los cientos de miles de perlas con millones de copias de ADN se secuencian en paralelo (Figura 1.7).

1.12.2. Reacción de pirosecuenciación

1. Durante el flujo de nucleótidos, la librería sstADN se incuba con las enzimas ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, más los sustratos adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y luciferina.

2. La adición de uno de los 4 dNTPs permite que si un nucleótido es complementario a la cadena molde en algún pocillo, la polimerasa extiende la hebra existente de ADN mediante la

adición de nucleótido(s). Es importante notar que si hay incorporación se libera PPI equivalente a la cantidad de dNTP incorporado.

3. La ATP-sulfurilasa convierte cuantitativamente el PPI en ATP en presencia de APS. El ATP generado permite la conversión de la luciferina en oxiluciferina por acción de la luciferasa, generando luz visible en cantidades proporcionales a la cantidad de ATP presente. La luz emitida se detecta por una cámara fotográfica con dispositivo de carga acoplada (CCD, Charge-Coupled Device) y se visualiza como un pico en un pirograma que analiza el software del ordenador. La intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados en un solo flujo de nucleótidos.

4. Para continuar con la secuenciación, es esencial la degradación de aquellos dNTPs que no han sido incorporados. La apirasa es la enzima encargada de ello.

5. Pueden adicionarse nuevos dNTPs para iniciar un nuevo ciclo.

La pirosecuenciación es el método de elección para la secuenciación de fragmentos cortos de ADN, detección de SNPs y análisis de metilación. Estos análisis son cruciales en investigación biológica, genética y en algunas aplicaciones médicas y forenses. Es totalmente automatizada, fiable y precisa, y permite el análisis de un gran número de muestras en un breve tiempo. Además su coste es más reducido que el de los métodos tradicionales de secuenciación.

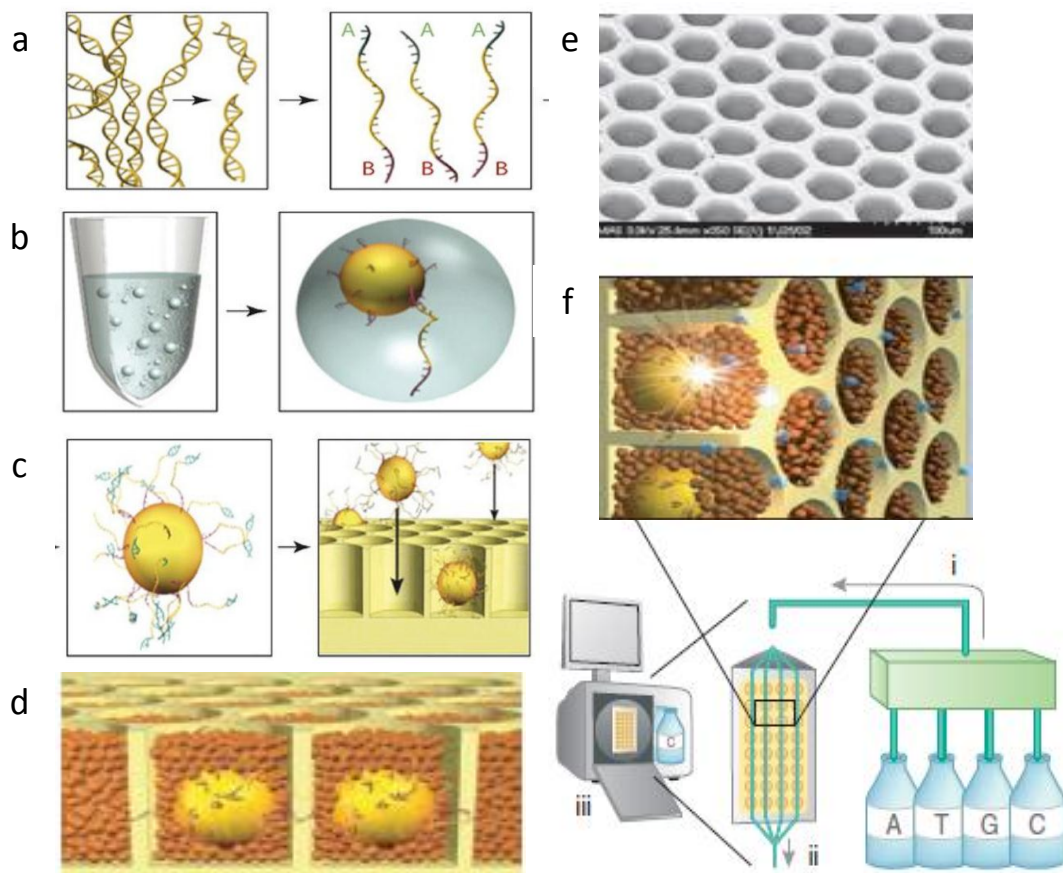


Figura 1.7. Tecnología de pirosecuenciación (Margulies et al. 2005; Rothberg y Leamon 2008). a) El ADN genómico aislado se fragmenta y se liga con los adaptadores A y B. b) Los fragmentos se ligan a las perlas y se emulsionan en una mezcla de aceite/agua. c) La emulsión se rompe, las hebras de ADN se desnaturalizan, y las cuentas llevan un molde de ADN de cadena simple y se depositan en los pocillos de una microplaca compuesta de fibra óptica deslizante. d) Se adicionan nuevas perlas más pequeñas que llevan inmovilizadas las enzimas necesarias para la reacción de pirosecuenciación. e) microfotografía electrónica de barrido de los pocillos con revestimiento de fibra óptica antes de depositar las cuentas. f) Secuenciador para pirosecuenciación equipado con i) ensamblaje de fluidos; ii) celda de flujo que incluye los pocillos de fibra óptica deslizante; iii) cámara CCD, y una computadora que provee la interfaz necesaria para el control del proceso de pirosecuenciación.

Una limitación de los sistemas NGS es la longitud de los fragmentos de ADN que se pueden secuenciar. En sus orígenes, las lecturas que proporcionaban las plataformas de secuenciación de segunda generación no superaban las 100 pb, aunque en los últimos años la

capacidad de secuenciación se ha ampliado a unas 450 pb (secuenciación 454, mediante la plataforma de secuenciación de segunda generación Genome Sequencing FLX, Roche). El nuevo sistema Genome Sequencing FLX + permite lecturas superiores a las 600 pb utilizando como molde ADN de hasta 1.000 pb de tamaño molecular. La investigación sobre pirosecuenciación es intensa y constante, por lo que es de esperar claros avances en el aumento de la longitud de las lecturas. Un desarrollo histórico de las tecnologías NGS, con indicación de las diversas plataformas se presenta en la Figura 1.8.

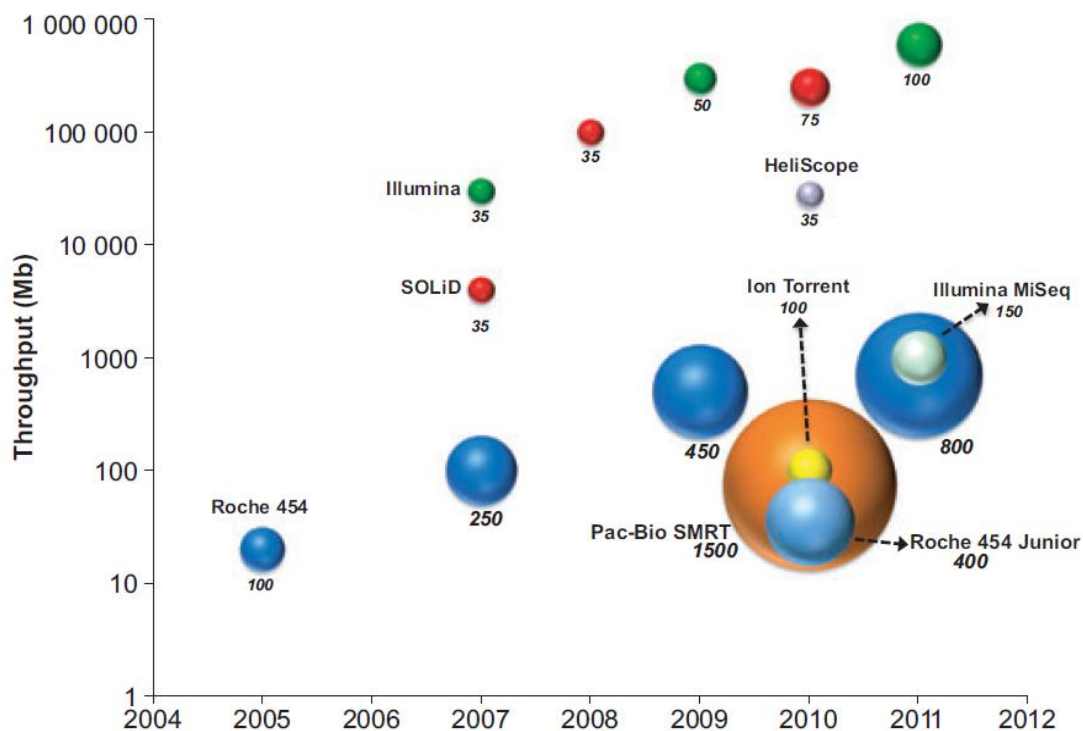


Figura 1.8. Desarrollo histórico de tecnologías NGS (Shokralla et al. 2012). El diámetro de cada burbuja representa la longitud de lectura de la plataforma de secuenciación (en pb). Los colores, corresponden a las diversas plataformas.

Aunque las tecnologías NGS utilizan diferentes herramientas, todas comparten la fragmentación de la librería y la detección de los nucleótidos que se incorporan (Glenn 2011; Zhang et al. 2011). Las tecnologías NGS se pueden clasificar en dos categorías principales. El primer grupo se basa en la PCR e incluye 4 plataformas comerciales: Roche 454 Genome Sequencer (Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA), HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), AB SOLiD™ System (LifeTechnologies Corp., Carlsbad, CA, USA) y Ion

Personal Genome Machine (Life Technologies, South San Francisco, CA, USA). El segundo grupo se denomina Single Molecule Sequencing (SMS), no está basado en la PCR y no incluye el paso de amplificación previo a la secuenciación. Recientemente, se han anunciado dos nuevos sistemas de secuenciación a los que se ha llamado Two Single-Molecule Sequencing Systems: HeliScope (Helicos Bio-Sciences Corp., Cambridge, MA, USA) y PacBio RSMRT system (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). Una excelente revisión sobre las tecnologías NGS disponibles se ha publicado recientemente por Shokralla et al. (2012).

2. OBJETIVOS

La FAO define el desarrollo sostenible “*como aquel que consiste en la ordenación y conservación de la base de recursos naturales y la orientación del cambio tecnológico e institucional, de tal manera que se asegure la continua satisfacción de las necesidades humanas para las generaciones presente y futuras. Este desarrollo conserva la tierra, el agua y los recursos genéticos vegetales y animales, no degrada el medio ambiente y es técnicamente apropiado, económicamente viable y socialmente aceptable*”.

Actualmente, se considera que la agricultura convencional es, en sí misma, una agricultura insostenible, ya que se le atribuyen problemas de degradación, de contaminación de aguas, suelos y atmósfera, de deterioro de la base genética para la producción de alimentos, etc. En contraste con este tipo de agricultura, las prácticas agrícolas campesinas, consideradas a veces como primitivas, e incluso erróneas, se reconocen ahora como apropiadas para el desarrollo de una agricultura sostenible ya que, entre otras características, se enfrentan y responden a problemas específicos de pendiente, inundación, sequía, plagas, enfermedades, baja fertilidad, pH, etc. La agricultura tradicional se establece a lo largo de siglos de evolución cultural y biológica, de manera que se desarrollan prácticas agrícolas que se adaptan a las condiciones locales de manera que permiten satisfacer las necesidades vitales durante siglos, aún bajo condiciones ambientales adversas. Esta experiencia de interacción entre el ambiente y el agricultor sin acceso a insumos externos, capital o conocimiento científico, ha guiado a los agricultores de todo el mundo al desarrollo de agroecosistemas sostenibles con recursos humanos locales.

El maíz amiláceo (*Zea mays*, L.) es el cereal de los pueblos y culturas del continente americano. Las más antiguas civilizaciones de América, desde los olmecas y teotihuacanos en Mesoamérica, hasta los incas y quechuas en la región andina de Sudamérica, utilizaron esta planta para su nutrición. EL maíz ha sido y es un factor de supervivencia para los campesinos e indígenas que habitan en los países del continente americano. En los Andes, el desarrollo de la agricultura relacionado con la “*sara mama*” es tan antiguo como su civilización. Desde hace siglos, el maíz forma parte de la identidad cultural del pueblo peruano. Se considera una planta sagrada, por lo que ha dado lugar a toda una cosmovisión que se refleja en los mitos, rituales y leyendas relacionados con este cultivo. Los campesinos cultivan el maíz como se hacía hace 7.000-8000 años y mantienen su producción sostenible desde entonces. Además utilizan sus propias semillas, lo que ha dado lugar a una extraordinaria diversidad de los maíces que cultivan. De ahí, que la desaparición de la agricultura tradicional andina resulte en

la disminución del germoplasma de los maíces amiláceos y, consecuentemente, en la pérdida de diversidad de tales maíces.

Una característica del cultivo de maíz en las chacras maiceras es que crece asociado a lo que los nativos llaman trébol andino (*Medicago hispida G.*), una leguminosa que aparece de forma innata y se desarrolla simultáneamente con él. A lo largo de su evolución, las leguminosas han desarrollado la capacidad de establecer asociaciones simbióticas fijadoras de N₂ atmosférico con diversos géneros de bacterias que forman nódulos en las raíces, a veces en los tallos y hojas de tales plantas. La utilización de leguminosas constituye, por tanto, una alternativa para reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados, lo que redundaría en una disminución significativa tanto en términos económicos como de contaminación medioambiental. Además, su empleo es de gran eficacia en revegetación y fitorrecuperación de suelos forestales. El empleo de leguminosas en la rotación de cultivos es frecuente ya que se ha demostrado que mejoran las condiciones físicas del suelo, aumentan la materia orgánica y la biodiversidad, evitan cambios bruscos de temperatura, conservan la humedad en el suelo, y disminuyen la incidencia de germinación de malezas, la escorrentía y la erosión. También se utilizan por la importancia económica de sus semillas y follajes, que se emplean en alimentación humana y animal.

Este trabajo se inició por tres motivos. Primero porque la incidencia del trébol andino es clave en la fertilidad del suelo de las chacras y en la sostenibilidad de la producción de los cultivos que los campesinos quechua crecen en ellas. Segundo, analizar la composición y estructura de las poblaciones microbianas del suelo de las chacras para tratar de definir su intervención en dicha fertilidad y sostenibilidad. En tercer lugar, estudiar las bacterias que utilizan las raíces del maíz como nicho ecológico y promueven el crecimiento de las plantas

De acuerdo con lo expuesto, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Aislar y caracterizar los endosimbiontes de los nódulos de plantas de trébol andino (*Medicago hispida G.*) crecidas en chacras maiceras de Allpas (Acobamba-Huancavelica, Perú).
2. Analizar la diversidad microbiana en suelo rizosférico y no rizosférico de 1) plantas de maíz cultivadas de forma tradicional, b) plantas de maíz tratadas con fertilizantes químicos, c) plantas de maíz cultivadas de forma tradicional (asociadas a trébol), y d) plantas de trébol andino.
3. Determinar la diversidad de bacterias endofitas en las raíces de maíz.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Localización geográfica

El Perú está ubicado en la parte occidental de Sudamérica, entre de las coordenadas 00° 01' 11" y 18° 21' 05" de latitud sur, y 68° 30' 11" y 81° 19' 35" de longitud oeste. Limita con Ecuador y Colombia al norte, Brasil al este, Bolivia al sureste, Chile al sur, y el Océano Pacífico al oeste. Es el tercer país de América del Sur en tamaño, con una superficie continental de 1.285.215,60 km², (0,87% del planeta), distribuida en 136.232,85 km² (10,6 %) en la región costa, 404.842,91 km² (31,5%) en la región andina y 754.139,84 km² (57,9%) en la región amazónica Su geografía le concede una elevada diversidad de ecosistemas, especies, recursos genéticos, minerales, culturales y humanos (Brack y Mendiola 2000).

El país está dividido en 24 departamentos y uno de ellos es el de Huancavelica, donde se encuentra la provincia y distrito de Acobamba, ubicado a una altitud media de 3.423 msnm (Figura. 3.1). Su clima es templado, con una temperatura media mínima anual de 2 °C y una máxima de 20 °C. Se trata de una provincia eminentemente agropecuaria. Los cultivos de importancia económica y agrícola son maíz, arveja, papa, haba, trigo y avena (Álvarez 2003).

En la provincia de Acobamba se encuentra la comunidad campesina de Allpas, ubicada a 3.400 m.s.n.m. Oficialmente está reconocida mediante R. D. No. 0032-93-DSRA-Hvca, registrada en la ficha No.0331, título 000332 del tomo 29 de Registros Públicos de Huancavelica. Su extensión territorial es 1.475,62 ha, de los cuales 1.100 ha son tierras de cultivo, 103 ha se dedican al cultivo de pastos naturales, y la diferencia, que corresponde a terrenos de cobertura arbórea y de conservación, se distribuye desde los 2.800 m.s.n.m. en el río Lircay hasta los 3.670 m.s.n.m. en el cerro Mukucho (<http://www.acobamba.hca.mp.gob.pe/indextur.html>).

3.2. El cultivo de maíz en la comunidad campesina de Allpas

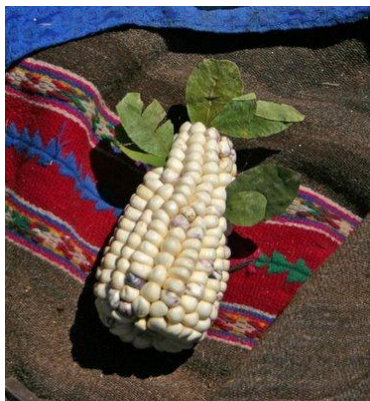


Figura 3.2. La *sara mama* en la ritualidad campesina

Como en la mayoría de las comunidades indígenas de la región quechua de los Andes, los campesinos de Allpas siembran sus chacras siguiendo la manera tradicional, como lo hicieron sus antepasados hace miles de años. Para ellos, hablar de la *sara mama* es hablar de toda una cultura ya que su presencia en la vivencia campesina es tan antigua como su propia historia, razón por la que forma parte inseparable de las familias campesinas. En torno al maíz se ha tejido toda una cosmovisión, ritualidad y regocijo, a nivel de ayllu, local y

regional (Valladolid 2003) (Figura 3.2).

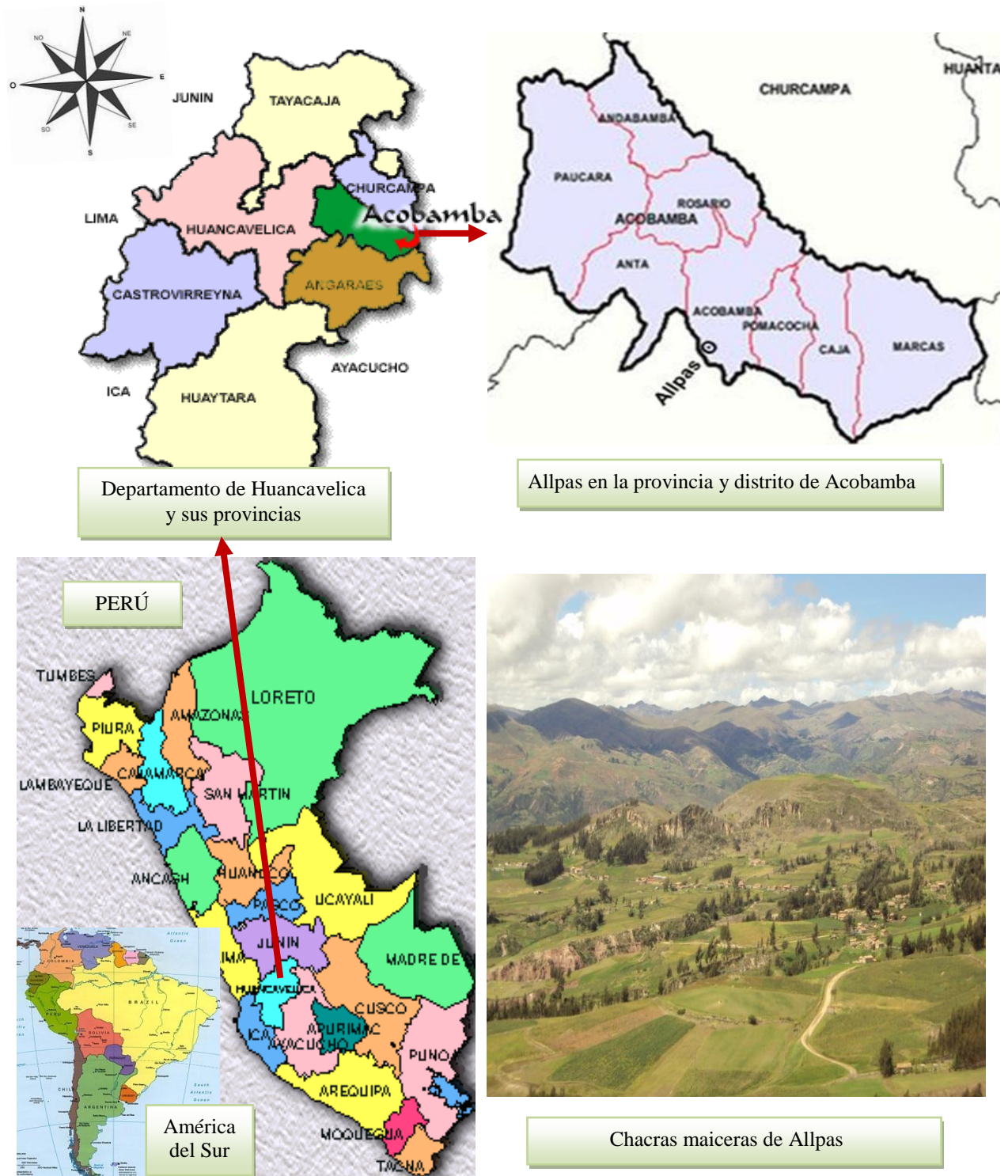


Figura 3.1. Localización de la Comunidad Campesina de Allpas en Acobamba-Huancavelica (Perú).

Los campesinos de Allpas siembran el maíz en régimen de monocultivo, con algunas rotaciones esporádicas, en chacras cuyo tamaño no sobrepasa los 10.000 m². Las chacras se



Figura 3.3. Siembra de maíz amiláceo en Allpas.

siembran con semillas propias de la comunidad y se abonan con el estiércol del ganado, principalmente vacuno y ovino, en condiciones de secano y no utilizan agroquímicos (Figura 3.3). De esta manera obtienen rendimientos de 3,5 a 6,0 t/ha. Aún más, en contraste con los monocultivos de la Costa, en Allpas, se siembra una extraordinaria variedad de maíces amiláceos, que difieren en color, tamaño, forma y textura del grano y mazorca (Figura 3.4). La diversidad de los maíces que emplea la agricultura tradicional andina es enorme, y así se mantiene desde hace miles de años (Manrique 1997; Valladolid 2003).



Figura 3.4. Diversidad de maíces amiláceos que se cultivan en las chacras

3.3. El trébol andino

Como en todas la chacras maiceras de la región quechua, una característica del cultivo del maíz es que crece asociado al denominado trébol andino, una leguminosa (*Medicago hispida*,



Figura 3.5. Asociación maíz-trébol andino en las *sara chacras* de Allpas

Gaertn), que aparece innata y se desarrolla simultáneamente con él (Figura. 3.5). La leguminosa emerge después del segundo aporque, aproximadamente 100 días después de la siembra del maíz.

Durante el período del cultivo de maíz se realizan labores esenciales como el deshierbo manual y los movimientos de tierras originados por el primer y segundo aporque, actividades que reducen la población de plantas arvenses. Pasado esta etapa de laboreo, que coincide con el periodo crítico de competencia de malezas, emergen las plantas de *M.*

hispida que crecen asociadas al maíz. Su crecimiento exuberante asfixia otras plantas tardíamente emergidas y evita su crecimiento.

Los campesinos de Allpas desconocen las bondades del trébol andino, lo consideran una



Figura 3.6. Mulch de trébol después de la cosecha del maíz en Allpas

maleza y lo retiran del campo para emplearlo como alimento de ganado. No obstante, el mulch generado por el trébol tiene efectos positivos sobre los suelos de las chacras maiceras ya que incrementan su contenido en N, aumentan la materia orgánica y la biodiversidad, evitan cambios bruscos de temperatura, conservan la humedad en el suelo, suprime la incidencia de malezas, y reduce la escorrentía y la erosión del suelo (Altieri y Nicholls 2000; Sustainable Agriculture Network 2007). Ello, sin olvidar la importancia económica de su follaje, que se emplea

en la alimentación animal (Bentley et al. 2001) (Figura. 3.6).

3.4. Medio de cultivo bacteriano

3.4.1. Medio YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970)

Se ha utilizado como medio de rutina para el cultivo de las bacterias utilizadas en este estudio. Su composición es la siguiente:

Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	1 l
pH	7.0

Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico (15 g/l). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

3.5. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían glicerol estéril (concentración final 20%) a los que se adicionaron alícuotas de los

distintos cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento (aprox. 10^8 células/ml). Los criotubos se almacenaron a - 80 °C.

3.6. Toma de muestras de suelo para análisis de sus propiedades físico-químicas

Se ha utilizado suelo de chacras cultivadas con maíz y trébol, trébol sólo, maíz sólo, maíz sólo fertilizado con nitrógeno, y de una chacra en descanso, cuyas georeferencias de altitud, latitud y longitud, se indican en la tabla 3.1. Las muestras se tomaron al azar, de 0 a 20 cm de profundidad, en 3 zonas distintas de cada chacra siguiendo la metodología propuesta por USDA (2009). Las muestras se enviaron a la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM-Lima, Perú), donde se analizaron en el laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes, que emplea la metodología descrita por Chapman y Pratt (1973).

Tabla 3.1. Localización de las chacras maiceras y sus cultivos

Georeferencia	Cultivos en las chacras maiceras				
	Maíz y trébol	Trébol	Maíz con fertilización nitrogenada	Maíz	Descanso
Altitud (m.s.n.m.)	3.537	3.528	3.473	3.470	3.475
Latitud Sur	12° 52' 02"	12° 52' 02"	12° 52' 17"	12° 52' 25"	12° 52' 15"
Longitud Oeste	74° 35' 17"	75° 35' 14"	77° 34' 97"	77° 35' 12"	76° 35' 02"

3.7. Toma de muestras de trébol andino para análisis foliar

Para la toma de muestras se siguió la metodología de Barbazan (1998), que utiliza tallos y hojas del tercio medio de plantas en período de floración. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM-Lima, Perú), que emplea la metodología descrita por Chapman y Pratt (1973).

3.8. Nomenclatura de las muestras

3.8.1. Para plantas y suelos

La nomenclatura de las muestras para evaluar la diversidad microbiana del suelo tiene dos componentes, el primero referido al tipo de cultivo y el segundo al tipo de suelo. Así, la muestra MT-SNR, corresponde a suelo no rizosférico (SNR) de la chacra cultivada con maíz y trébol (MT) (Tabla 3.2). La chacra 1 se dedica al cultivo del maíz asociado a trébol, y así permanece desde hace al menos, 20 años. La chacra 2 se cultiva con fertilización nitrogenada

(80 kg de N/ha) durante, al menos, 5 años. La chacra 3 estuvo en descanso durante 5 años y, al año siguiente, se cultivó sólo con maíz. Durante el período de descanso la chacra está sometida a constante pastoreo, lo que previene el desarrollo del trébol. Antes de tomar las muestras, la chacra 5 ha estado en descanso durante 2 años.

Tabla 3.2. Nomenclatura de las muestras de suelo rizosférico y no rizosférico

Chacras	Tipo de cultivo	Tipo de suelo	Nomenclatura
Chacra 1	Maíz y trébol	Rizosférico	MT-SR
		No Rizosférico	MT-SNR
Chacra 2	Maíz con fertilización química	Rizosférico	MF-SR
		No Rizosférico	MF-SNR
Chacra 3	Maíz	Rizosférico	M-SR
		No Rizosférico	M-SNR
Chacra 4	Trébol	Rizosférico	T-SR
		No Rizosférico	T-SNR
Chacra 5	Suelo en descanso	No Rizosférico	D

3.8.2. Para endofitos

Para la nomenclatura de endofitos, la muestra MT corresponde al suelo de la chacra cultivada con maíz asociado con trébol.

3.9. Experimentos de planta trampa

3.9.1. Preparación de macetas y siembra de semillas



Figura 3.7. Macetas con *M. hispida*

A partir de 2,5 kg de suelo no rizosférico de la chacra donde crecía maíz asociado con trébol andino se prepararon 8 macetas de 0,5 kg que contenían suelo y arena estéril (1:1 v/v) (Figura 3.7). Las semillas de trébol andino (*M. hispida* G.) se esterilizaron en superficie mediante inmersión en 2,5% HgCl₂ durante 9 minutos, se lavaron al menos 10 veces con abundante agua destilada estéril, se mantuvieron en imbibición durante 24 h y, finalmente, se emplearon para sembrar las macetas (8 semillas/maceta). Las macetas se trasladaron a un invernadero provisto de luz artificial (Silvania/Grolux) funcionando en las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad, 25 °C/18 °C de temperatura

día/noche y una humedad relativa del 70-75%. Las plantas se regaron con agua estéril de acuerdo a las necesidades del cultivo y se cultivaron durante 30 d.

3.9.2. Esterilización de nódulos y aislamiento de sus endosimbiontes

Después de su cultivo, las plantas se sacaron de las macetas y sus raíces se lavaron con agua estéril. Los nódulos de cada planta se mezclaron y 12 de ellos, elegidos al azar, se esterilizaron con HgCl_2 al 0,25% durante 5 minutos y se lavaron abundantemente con agua destilada estéril. Cada uno de los nódulos se depositó en una placa Petri, se le adicionó 2 gotas de agua estéril y se homogeneizó con una varilla de vidrio también estéril. El extracto resultante se utilizó para inocular placas Petri que contenían medio YEM (Vincent 1970). Para comprobar la eficacia de la esterilización, 3 nódulos sin machacar se rodaron sobre placas rellenas con medio YEM. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C durante 8 días. Las unidades formadoras de colonias (UFCs) con diferente morfología que aparecieron en las placas se seleccionaron mediante inspección ocular con una lupa de aumento 10X, y cada una de ellas se resembró en el mismo medio hasta la obtención de colonias morfológicamente uniformes.

3.10. Identificación genotípica de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino

3.10.1. Cultivo bacteriano

Cada una de las cepas obtenidas se sembró en tubos de vidrio con 3 ml de medio líquido YEM y se incubó a 30 °C, en agitación a 120 r.p.m. durante 24 a 72 horas, tiempo necesario para que la densidad celular de las diferentes cepas bacterianas, determinada espectrofotométricamente a 600 nm de longitud de onda, fuera ~ 0.6. Posteriormente, las células se recogieron mediante centrifugación de los cultivos en una microfuga a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos, a temperatura ambiente. Cuando una de las cepas producía abundante polisacárido, las células se lavaron con sarkosil al 0,1% en solución tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

3.10.2. Obtención de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se utilizó el producto comercial Real Pure Genomic ADN Extraction, de Durviz, siguiendo las instrucciones del fabricante. En esencia:

- a. Sedimentar las células (3 ml de cultivo) por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos en microtubos.
- b. Eliminar el sobrenadante y pesar el sedimento (20-40 mg).

- c. Resuspender el sedimento en 500 μl de tampón de extracción[®]. Adicionar 100 μl de solución de PVP[®] y agitar en vortex durante 20 s.
- d. Adicionar 60 μl de solución de lisis y 3 μl de ARNasa. Agitar la mezcla vigorosamente mediante vortex e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- e. Enfriar las muestras a temperatura ambiente y adicionar 250 μl de tampón de precipitación de proteínas[®]. Agitar vigorosamente mediante vortex durante 20-30 s, e incubar a - 20 °C durante 10 minutos.
- f. Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. Comprobar la aparición de precipitado proteico.
- g. Recoger el sobrenadante, que contiene el ADN, en un microtubo con 600 μl de isopropanol conservado a - 20 °C. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar de nuevo a 14.000 r.p.m. durante 3 minutos.
- h. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 600 μl de etanol al 70%. Mezclar de nuevo por inversión. Centrifugar de nuevo a 14.000 r.p.m. durante 2 minutos.
- i. Eliminar el etanol y secar al aire mediante inversión del tubo sobre papel absorbente.
- j. Resuspender el precipitado en 50 μl de agua destilada estéril o tampón de hidratación[®]. Favorecer la resuspensión del ADN mediante inmersión del tubo en agua durante 30 minutos a 65 °C. Agitar manualmente de vez en cuando para asegurar la total resuspensión.
- k. Almacenar a -20 °C hasta su uso.

3.10.3. Cuantificación del ADN

Se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop, modelo ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La relación $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ se empleó para estimar la pureza de la preparación.

3.11. Identificación de endofitos aislados de nódulos

3.11.1. Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-Polymerase Chain Reaction (PCR) (REP-PCR).

Se utilizaron los cebadores REPIR-I y REP2-I descritos por de Bruijn (1992):

Cebador	Secuencia
REP2-I	5'-ICG ICT CIG GCC TAC-3'
REPIR-I	5'-III ICG ICG ICA ICI GGC-3'

y la siguiente mezcla de reacción:

Productos y concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración Final
Tampón de reacción 10X	2,5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	7,0	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	3,15	0,2 mM
DMSO (99,5%)	2,5	
REP2-I (100 pmol de cada uno)	0,5	50 pmol
REPIR-I (100 pmol de cada uno)	0,5	50 pmol
ADN polimerasa (Sigma)	0,4	2 U
ADN	1,0	50-100 ng
Agua MQ (Millipore)	Hasta 25	
Volumen total	25,0	

DMSO, dimetil sulfóxido; dNTPs, deoxirribonucleótidos trifosfato.

En el termociclador (Eppendorf Master Cycler) se utilizó el siguiente programa:

Ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)	
1	95	6	Desnaturalización inicial
30	94	1	Desnaturalización
	40	1	Annealing: hibridación y unión cebador
	65	8	Elongación
1	65	16	Elongación final
∞	15	∞	Mantenimiento

Los productos de PCR (5-10 μ l) se suplementaron (4:1 v/v) con solución de carga (SC, 40% sacarosa y 0,25% azul de bromofenol) y se emplearon para cargar geles de agarosa al 1,2% preparados en solución tampón TBE (trizma base, 10 g/l; ácido bórico 5,5 g/l y EDTA, 0,90 g/l, pH 8.5). La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 60 V. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el denominado Molecular Marker III (Roche). El análisis comparativo de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante REP-PCR se realizó empleando el paquete informático InfoQuest FP (versión 4.5) (Bio-Rad).

3.11.2. Amplificación del gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA se llevó a cabo utilizando los cebadores fD1 y rD1 descritos por Weisburg et al. (1991).

Cebador	Secuencia
fD1	5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
rD1	5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

y la siguiente mezcla de reacción:

Productos (concentración inicial)	Volumen (μ l)	Concentración final
Tampón de reacción 10X	2,5	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	1,0	200 μ M
fD1 (15 pmol/ μ l)	1,0	0,6 picomol/ μ l
rD1 (15 pmol/ μ l)	1,0	0,6 picomol/ μ l
ADN polimerasa (Sigma)	0,2	0,08 U
ADN	1,0	20-100 ng
Agua MQ (Millipore)	Hasta 25	
Volumen total	25,0	

En el termociclador (Eppendorf Master Cycler) se utilizó el siguiente programa:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	
1	95	9	Desnaturalización inicial
30	95	1	Desnaturalización
	60	1	Annealing: hibridación y unión cebador
	72	2	Elongación
1	72	7	Elongación final
∞	4	∞	Mantenimiento

Los productos de PCR (4-5 µl) se suplementaron (4:1 v/v) con SC y se emplearon para cargar geles de agarosa al 0,7% preparados en solución tampón TBE. La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 60 V. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el denominado Molecular Marker III (Roche). En los geles debe comprobarse la presencia de una banda de ADN de tamaño molecular aproximado de ~ 1.500 pares de bases (pb).

3.11.3. Amplificación y secuenciación de los genes, *glnII*, *atpD* y *recA*

Los genes *glnII*, *atpD* y *recA* se amplificaron usando los pares de oligonucleótidos que se indican a continuación:

Gen	Cebador	Secuencias	Referencia
<i>atpD</i> Subunidad beta de la ATP sintasa	273f	5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT-3'	Gaunt et al. 2001
	771r	5'-GCCGACACTTCCGAACCGCCTG-3'	
<i>glnII</i> Glutamina sintetasa II	12F	5'-YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT-3'	Vinuesa et al. 2005
	689R	5'-TGCATGCCSGAGCCGTTCCA-3'	
<i>recA</i> ADN recombinasa A	41F	5'-TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG-3'	Vinuesa et al. 2005
	640R	5'-ACATSACRCCGATCTTCATGC-3'	

y la siguiente mezcla de reacción:

Producto y concentración inicial	Volumen (µl)	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	<i>recA</i>
		Concentración final	Concentración final	Concentración final
Tampón de reacción 10X	2,5	1X	1X	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
Dimethylsulfoxide (DMSO)	2,5	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,5	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
Cebadores (4 µM de cada uno)	0,75	7,5 pmol	7,5 pmol	7,5 pmol
ADN polimerasa (Sigma)	0,1	0,5 U	0,5 U	0,5 U
ADN	1,0	50-200 ng	50-200 ng	50-200 ng
Agua MQ (Millipore)	15,4	hasta 25 µl	hasta 25 µl	hasta 25 µl
Volumen total	25			

El programa que se empleó en el termociclador (Eppendorf Master Cycler) fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	
1	95	3,5	Desnaturalización inicial
30	93,5	1	Desnaturalización
	58	0,66	Annealing: hibridación y unión del cebador
	72	1	Elongación
1	72	5	Elongación final
∞	4	∞	Mantenimiento

Los productos de PCR (4-5 µl) se suplementaron (4:1 v/v) con SC y se emplearon para cargar geles de agarosa al 1% preparados en solución de electroforesis TBE. La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 60 V. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se empleó el marcador de 75 - 20.000 pares de bases (Fermentas). En los geles debe comprobarse la presencia de una banda de ADN de tamaño molecular aproximado de 550 pb, de 600 pb y de 700 pb, que corresponden a los tamaños moleculares de los productos de los genes *atpD*, *glnII* y *recA*, respectivamente.

3.11.4. Amplificación y secuenciación del gen de nodulación *nodC*

El gen *nodC* se amplificó usando los siguientes pares de oligonucleótidos:

Gen	Cebador	Secuencias	Fuente
<i>nodC</i>	nodCF	5'- AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3'	Laguerre et al. 2001
	nodCI	5'- CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3'	

y la siguiente mezcla de reacción:

Producto y concentración Inicial	Volumen (µl)	Concentración Final
Tampón de reacción 10X	2,5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,5	1,25 mM
nodCF (4 µM de cada uno)	1,5	15 pmol
nodCI (4 µM de cada uno)	1,5	15 pmol
ADN polimerasa (Sigma)	0,2	1 U
ADN	1,0	50-100 ng
Agua MQ	hasta 25 µl	
Volumen total	25 µl	

El programa de amplificación que se empleó en el termociclador (Eppendorf Master Cycler) fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	
1	95	3	Desnaturalización inicial
35	94	1	Desnaturalización
	55	1	Aannealing: hibridación y unión cebador
	72	2	Elongación
1	72	7	Elongación final
∞	4	∞	

Los productos de PCR (4-5 µl) se suplementaron (4:1 v/v) con SC y se emplearon para cargar geles de agarosa al 1% preparados en solución de electroforesis TBE. La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 60 V. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se empleó el marcador de 75 - 20.000 pares de bases (Fermentas). En los geles

debe comprobarse la presencia de una banda de ADN de tamaño molecular aproximado de 900 pb, que corresponde al tamaño molecular del producto del gen *nodC*.

3.11.5. Purificación de los productos de amplificación

En todos los casos, después de su amplificación mediante PCR, el ADN se purificó utilizando el producto comercial QIAquick PCR Product Purification Kit (QIAGEN®), como se describe a continuación:

- a. Adicionar 5 volúmenes de solución PB® al producto de PCR. Mezclar por inversión manual.
- b. Pasar la mezcla a una columna de purificación®, adaptarle el tubo receptor y centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- c. Eliminar el líquido del fondo del tubo receptor.
- d. Adicionar 570 µl de solución PE® previamente suplementada con 220 µl de etanol. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- e. Eliminar el líquido del fondo del tubo receptor. Centrifugar de nuevo a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- f. Colocar la columna sobre un nuevo microtubo, adicionar 20-50 µl de agua destilada estéril en el centro de la columna, esperar 1 minuto y, finalmente, centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- g. El ADN purificado se cuantificó de la forma descrita en el apartado 3.10.3.
- h. Mantener el ADN a -20 °C hasta su uso.

3.11.6. Secuenciación de ADN y análisis informático de las secuencias

La mezcla de reacción para secuenciación de ADN se preparó en un microtubo de 0,5 ml que contenía ADN (40-100 ng), el cebador específico (6,4 picomoles) y agua bidestilada hasta un volumen final de 12 µl. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un equipo Perkin Elmer, modelo ABI PRISM 3130xl, provisto de 16 capilares de 80 cm de longitud, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la ADN polimerasa Amplitaq FS. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos.

Las secuencias obtenidas se visualizaron y limpiaron mediante el programa CHROMAS (disponible gratis en Internet, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y se compararon con las depositadas en GenBank mediante el programa BLASTN disponible tanto en el European Bioinformatic Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk>) como en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/).

El análisis filogenético se realizó empleando el programa MEGA5 (Tamura et al. 2011). Este sistema utiliza ClustalW (Thompson et al. 1994) para los alineamientos, el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura 1980) para el cálculo de distancias y el algoritmo neighbor-joining de Saitou y Nei (1987) para la elaboración del árbol filogenético. El análisis de confianza (bootstrap) se basó en 1.000 repeticiones. Las tablas de similitudes se construyeron utilizando Phydit versión 3.1 (Chun, 2001), que emplea ClustalX (Larkin et al. 2007) para alinear las secuencias.

3.12. Experimentos de nodulación

3.12.1. Preparación de los inóculos

Los inóculos bacterianos se obtuvieron a partir de cultivos frescos en medio sólido YEM que se recogieron con 5-10 ml del mismo medio líquido utilizando una espátula de Drigalsky hasta obtener una suspensión bacteriana de, aproximadamente, 10^8 células viables por ml. La cantidad de células viables se estimó calculando el número de UFCs. Cada semilla se inoculó con 1 ml de la correspondiente suspensión bacteriana.

3.12.2. Esterilización de semillas

La esterilización de las semillas se llevó a cabo de la manera descrita en el apartado 3.9.1.

3.12.3. Cultivo de plantas en jarra Leonard

La jarra Leonard (Leonard 1943) consiste en un sistema de dos recipientes independientes, de los que el superior se rellena con vermiculita y el inferior con solución nutritiva mineral. Ambas partes están conectadas por una mecha de papel de filtro. El conjunto se esteriliza mediante autoclave a 120 °C durante 20 minutos. En la superficie de la vermiculita se realizan unos agujeros con una varilla estéril de vidrio donde se colocan las semillas ya desinfectadas y embebidas en agua destilada estéril (ver apartado 3.9.1). Cada semilla se inocula con 1 ml de la suspensión bacteriana en estudio. La capa superficial de vermiculita se cubre con perlita estéril, que evita la posible contaminación ambiental y refleja la luz, por lo que previene el

calentamiento excesivo de las semillas. Cada jarra se envuelve en papel opaco a la luz para evitar que ésta alcance las raíces.

3.12.4. Solución mineral para el cultivo de plantas

Se ha empleado la solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975), cuya composición se describe a continuación:

Macroelementos (por litro de agua)

KH_2PO_4	68 mg
K_2HPO_4	44 mg
$\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$	123 mg
K_2SO_4	174 mg
SO_4Ca	173 mg
EDTA férrico (forma comercial Secuestrene)	25 mg.

Microelementos (por litro de agua):

$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,11 mg
BO_3H_3	2,85 mg
$\text{SO}_4\text{Mn} \times 4\text{H}_2\text{O}$	3,07 mg
$\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,55 mg
$\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,20 mg

La solución se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

3.13 Análisis de la diversidad bacteriana en las chacras maiceras

3.13.1. Toma de muestras de suelo rizosférico y no rizosférico

La toma de muestras del suelo de las diferentes chacras (Tabla 3.1) se realizó el 01 de abril de 2010. Se utilizaron 15 plantas/chacra, de las que se recogió el suelo íntimamente adherido a la raíz hasta obtener unos 200 g de suelo rizosférico. En todos los casos, las plantas estaban en buen estado fitosanitario. Las plantas de maíz se encontraban en el periodo de llenado de granos y las de trébol al 10% de floración, aproximadamente. El suelo se guardó en tubos estériles tipo Falcon hasta su procesamiento en la EEZ-CSIC en Granada, España. El muestreo del suelo no rizosférico se realizó en un espacio libre de la influencia de las raíces de las plantas, a una profundidad de 0-20 cm., similar a la de las raíces del maíz y trébol andino. Para cada tipo de suelo se tomaron 3 muestras en diferentes localizaciones de las chacras.

3.13.2. Extracción de ADN

De cada una de las 3 muestras de suelo se tomaron 3 alícuotas, a partir de las cuales se llevó a cabo el aislamiento de ADN. Para ello, se ha utilizado la metodología descrita por Martin-Laurent et al. (2001), con algunas modificaciones, como se indica a continuación:

- a. Previamente, calcular el contenido en agua del suelo de cada una de las chacras. Pesar la cantidad equivalente a 0,25 g de suelo seco. Mantener a a -80 °C hasta su empleo.
- b. Adicionar 0,5 g de cuentas de vidrio de 105 µm y 2 cuentas de vidrio de 2 mm a cada una de las muestras de suelo.
- c. Adicionar 1 ml de tampón de extracción formado por 100 ml de Tris HCl 1 M (pH 8), 200 ml de EDTA 0,5 M (pH 8), 100 ml de NaCl 1 M, 50 ml de PVP40 al 20%, y 100 ml de SDS en 450 ml de agua. Las muestras se sometieron a agitación mecánica (1.600 r. p. m. durante 30 s) usando un homogeneizador (mini bead beater) previamente enfriando a -20 °C. Inmediatamente después incubar 10 minutos a 70 °C y centrifugar 1 minuto (14.000 x g a 4 °C). Recoger el sobrenadante, (aproximadamente 0,75 ml), y transferirlo a un nuevo tubo.
- d. Adicionar al sobrenadante 1/10 de su volumen de una solución 5 M de acetato sódico (pH 5,5). Agitar en vortex e incubar en hielo durante 10 minutos. Centrifugar 5 minutos a 14.000 x g y 4 °C. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo.
- e. Adicionar isopropanol frío (-20 °C) en proporción 1:1 v/v del sobrenadante. Incubar a -20 °C un mínimo de 15 minutos, aunque es posible dejarlo toda una noche. Pasado este periodo, centrifugar 30 minutos a 14.000 x g a 4 °C y eliminar el sobrenadante. Lavar el sedimento con etanol frío al 70% con cuidado de no resuspenderlo. Centrifugar 15 minutos a 14.000 x g a 4 °C. Eliminar los residuos de etanol y evaporar las trazas del mismo mediante desecación durante 15 minutos a 37 °C. Resuspender el sedimento en 100 µl de tampón TE (pH 8), que debe contener el ADN.

3.13.3. Purificación del ADN

Se ha utilizado el producto comercial GeneClean[®] Turbo Kit (MP Biomedicals), cuyos componentes son: (1) GeneClean[®] Turbo Salt Solution, (2) GeneClean[®] Turbo Wash Concentrate, (3) GeneClean[®] Turbo Cartridges, (4) GeneClean[®] Turbo Catch Tubes y (5) GeneClean[®] Turbo Elution Solution. Su empleo se describe a continuación:

- a. Adicionar 5 volúmenes de GeneClean[®] Turbo salt solution a un volumen conocido de la solución de ADN y mezclar. Las muestras con una concentración mayor de 10 µg de ADN se deben diluir o dividir, porque la columna soporta solamente hasta 10 µg de ADN.
- b. Depositar < 600 µl de la mezcla de ADN sobre el filtro GeneClean[®] Turbo Cartridges (este dispositivo lleva inserto un filtro o membrana Glassmilk[®] que captura el ADN) previamente colocado dentro de un tubo de captura sin tapa.
- c. Centrifugar a < 14.000 x g hasta que todo el líquido haya pasado a través del filtro, aproximadamente unos 5 s. Repetir este procedimiento con el volumen remanente de la solución de mezcla de ADN. Vaciar el tubo de captura según sea necesario.
- d. Adicionar 500 µl de GeneClean[®] Turbo Wash Solution al filtro (GeneClean[®] Turbo Cartridges)
- e. Centrifugar a < 14.000 x g durante 5 s. Vacíe el tubo de captura.
- f. Volver a centrifugar el filtro GeneClean[®] Turbo Cartridges colocado dentro del tubo de captura a < 14.000 g por un tiempo adicional de 4 minutos para eliminar los residuos de la solución de lavado (GeneClean[®] Turbo Wash Solution).
- g. Colocar el GeneClean[®] Turbo Cartridges (GeneClean[®] Turbo Cartridges contiene el ADN), en un nuevo tubo de captura llamada GeneClean[®] Turbo Catch.
- h. Adicionar 30 µl de GeneClean[®] Turbo Elution Solution directamente sobre la membrana Glassmilk[®] integrada en el GeneClean[®] Turbo Cartridges e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- i. Centrifugar a < 14.000 x g durante 1 minuto para transferir el ADN como eluido al tubo de captura GeneClean[®] Turbo Catch. Una vez centrifugado, descartar el GeneClean[®] Turbo Cartridge y recoger el tubo de captura que contiene el ADN. El ADN está listo para su uso.

3.13.4. Comprobación y cuantificación del ADN

Es conveniente comprobar la presencia y calidad del ADN después de su extracción y purificación, Par ello, en ambos casos, alícuotas de 5 µl de la solución de ADN se suplementaron con 3 µl de SC y la mezcla se empleó para cargar geles de agarosa al 1% preparados en solución tampón TBE. La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 60 V. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el denominado Molecular Marker III (Roche). En los geles debe comprobarse una banda superior a 20 kpb, a

veces se nota presencia ADN degradado con valores inferiores. La concentración de ADN se cuantificó como se indica en el apartado 3.10.3

3.14. Aislamiento e identificación de endofitos de las raíces de plantas de maíz amiláceo

3.14.1. Experimentos de planta trampa

Se ha utilizado suelo no rizosférico de la chacra cultivada con maíz asociado con trébol



Figura 3.8. Emergencia y crecimiento del maíz amiláceo

andino (MT) y suelo de la chacra en descanso (D) que se mezclaron, de forma independientemente, con arena estéril (1:1 v/v) para preparar macetas de 2 kg (Figura. 3.8). Las macetas (5 macetas/tratamiento) se sembraron con semillas (3 semillas/maceta) de maíz amiláceo proporcionadas por los campesinos de Allpas. Previamente, las semillas se esterilizaron en superficie mediante tratamiento con alcohol etílico al 70% durante 5 minutos, posterior inmersión

en NaOCl al 5% durante 4 minutos y, finalmente, abundante lavado con agua destilada estéril (Nassar et al. 2005). Después de la emergencia, y una vez bien establecidas, se dejó una sola planta/maceta. Las macetas se colocaron en un invernáculo, a temperatura ambiente, en las dependencias de la Estación Experimental del Zaidín-CSIC, en Granada. Las plantas se cultivaron durante 70 d, desde el 12 de abril hasta el 21 de junio de 2011. Durante este tiempo se regaron con agua estéril de acuerdo a las necesidades del cultivo.

3.14.2. Esterilización de raíces y aislamiento de endofitos



Figura 3.9. Raíces de maíz para aislamiento de endofitos

Se ha seguido la metodología descrita por McInroy y Kloepper (1995). Para ello, las plantas de maíz se cortaron unos 5 cm por encima del nivel del suelo (Figura 3.9), y las raíces se lavaron con abundante agua estéril. Las raíces de cada tratamiento se esterilizaron superficialmente de la siguiente manera:

a. Aproximadamente 0,5 g de raíces

previamente cortadas en secciones de 2 mm de diámetro y 5 cm de largo (Manter et al. 2010) se colocaron en tubos Falcon y se lavaron abundantemente (5 veces al menos) con agua destilada estéril de manera que se elimine todo el suelo adherido a la raíz.

b. Sumergir las raíces en etanol al 99% durante 60 s. Tapar herméticamente el tubo Falcon y agitar manualmente. Eliminar el etanol.

c. Adicionar NaOCl al 5% durante 15 minutos. Agitar cada cierto tiempo.

d. Eliminar el NaOCl y sumergir nuevamente las raíces en etanol al 99% durante 30 s.

e. Lavar 5 veces con agua destilada estéril

f. Colocar las raíces en un mortero empleando una pinza estéril y cortarlas con un escalpelo en trozos de aproximadamente de 0,5 cm de tamaño.

g. Adicionar 1 ml de tampón fosfato 67 mM y homogeneizar las raíces con una varilla de vidrio estéril.

h. Utilizar el extracto resultante para inocular placas Petri con medio YEM (Vincent 1970).

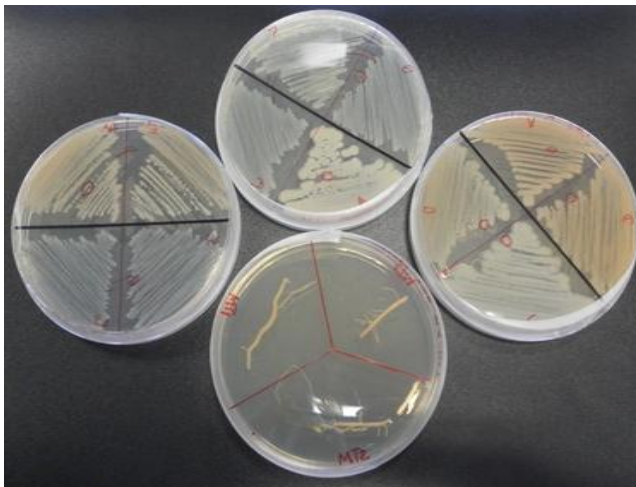


Figura 3.10. Crecimiento en medio YEM de endofitos aislados de raíces de maíz amiláceo.

Para comprobar la eficacia de la esterilización, 3 raíces se frotaron sobre placas Petri rellenas con medio YEM (Figura 3.10). Todos los cultivos se incubaron a 30 °C durante 8 d. Las unidades formadoras de colonias (UFCs) con diferente morfología que aparecieron en las placas se seleccionaron mediante inspección ocular con una lupa de aumento 10X y cada una de ellas se sembró en placas Petri con medio

YEM hasta la obtención de colonias morfológicamente uniformes.

3.14.3. Identificación de endofitos de las raíces de maíz amiláceo

Se llevó a cabo mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA de manera similar a la descrita para identificar los endosimbiontes de los nódulos de trébol andino (ver apartados 3.10.1, 3.10.2 y 3.10.3).

3.14.4. Aislamiento de ADN de las raíces de maíz amiláceo

Se utilizaron 3 plantas de maíz, cada una de una maceta diferente de las cultivadas en condiciones de invernáculo. De cada grupo de raíces (1 g) se tomaron 3 submuestras (0,25 g) luego, se cortaron y esterilizaron de forma independiente de la manera descrita en el apartado 3.14.2. Además, para facilitar el aislamiento, una vez estéril superficialmente las raíces, se cortaron en piezas de, aproximadamente, 1 mm de longitud. El aislamiento, purificación y cuantificación de ADN de endofitos del maíz, se realizó como se indica en los apartados 3.13.2, 3.13.3 y 3.13.4, respectivamente.

3.15. Pirosecuenciación

La diversidad bacteriana en suero rizosférico y no rizosférico, así como de los endofitos de las raíces de maíz amiláceo, se evaluó mediante pirosecuenciación utilizando el sistema 454 GS FLX Titanium lo que llevó a cabo la empresa Life Sequencing S. L. (Valencia, España).

3.15.1. Amplificación del gen 16S rRNA

Se han utilizado los cebadores U519F y U926R descritos por Baker et al. (2003), que reconocen las regiones hipervariables V4 y V5 del gen. Para cada ADN a amplificar, los cebadores se complementaron en sus extremos 5' y 3' con una secuencia de 8 nucleótidos (MID, Multiplex Identifier) (Parameswaran et al. 2007), que permiten la identificación del producto amplificado y unas secuencias de ADN que, a modo de adaptadores, son necesarios para la pirosecuenciación como describen Roesch et al. (2007), Margulies et al. (2005) y Knapp y Hofreiter (2010). Las secuencias de los cebadores, de los MIDs y de los adaptadores utilizados para amplificar el ADN aislado del suelo y el de las raíces de maíz se indican en las tablas 3.4 y 3.5, respectivamente.

Tabla 3.4. Secuencias de los adaptadores, MIDs y cebadores utilizados para amplificar el gen 16S rRNA de cada una de las muestras de ADN aislado de suelo rizosférico (SR) y no rizosférico (SNR) de la chacras de Allpas.

Muestra	Nombre del cebador	Adaptador	MID	Secuencia del cebador
MT-SR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	CCGTTACG	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	CCGTTACG	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
MT-SNR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	TTAGGTAC	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	TTAGGTAC	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
MF-SR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	CCTGGCAT	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	CCTGGCAT	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
MF-SNR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	AAGAACGT	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	AAGAACGT	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
M-SR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	TTCAAGTC	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	TTCAAGTC	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
M-SNR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	CCATTGCA	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	CCATTGCA	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
T-SR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	CCTCCTGA	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	CCTCCTGA	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
T-SNR	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	GGCAATGC	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	GGCAATGC	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'
D	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	GGCTTCAG	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	GGCTTCAG	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'

Tabla 3.5. Secuencias de los adaptadores, MIDs y cebadores utilizados para amplificar el gen 16S rRNA de cada una de las muestras de ADN aislado de las raíces de maíz amiláceo.

Muestra	Nombre del cebador	Adaptador	MIDs	Secuencia del cebador
MT	U519F	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'	CCGTTACG	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'
	U926R	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'	CCGTTACG	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'

La mezcla de reacción para la amplificación del ADN es la recomendada por Life Sequencing S. L., cuya composición se indica a continuación:

Producto y concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración Final
Taq Master 5X	5,0	5 µl
Taq Buffer con Mg ² 10X	2,5	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0	2,5 mM
dNTPs (10 mM)	1,0	0,25 mM
U519F (10 mM)	1,0	0,4 µM
U926R (10 mM)	1,0	0,4 µM
Taq ADN polimerasa	0,15	0,75 U
ADN molde	1,0	3-6 ng
Agua MQ	12,35	
Volumen total	25,0	

El programa de amplificación que se empleó en el termociclador (Eppendorf Master Cycler) fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	
1	94	180	Desnaturalización inicial
25	94	15	Desnaturalización
	55	45	Hibridación de las cadenas de ADN y unión de los cebadores (“annealing”)
	72	60	Elongación
1	72	480	Elongación final
∞	4	∞	Mantenimiento

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% preparados en solución tampón TAE (40 mM Tris acetato (pH8.0) y 1 mM (Na₂EDTA), sometido a una corriente continua de 80 V por una hora. Antes de la carga, las alícuotas de ADN se suplementaron (5:1 v/v) con SC. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de peso molecular se

utilizó ADN del fago Φ 29 digerido con *Hind*III (Servicio de Fermentación-CBM-UAM). Este marcador se compone de 14 fragmentos de ADN de 72, 156, 273, 453, 579, 611, 759, 1.150, 1.331, 1.933, 2.201, 2.498, 2.899 y 4.370 bp.

3.15.2. Purificación de los productos de amplificación

Mientras que el empleo como molde del ADN amplificado a partir de muestras de suelo resultó en la presencia de una única banda de ADN de tamaño molecular aproximado de 0.474 kb en los geles de agarosa, la amplificación del ADN procedente de las raíces de maíz resultó en la presencia de dos bandas de ADN con tamaños aproximados de 0.6 y 0.474 kb. En este último caso, para prevenir problemas durante la pirosecuenciación, el aislamiento de ADN se llevó a cabo mediante su extracción de geles de agarosa empleando el sistema Illustra™ GFX™ (GE Healthcare). Los protocolos correspondientes a cada procedimiento se exponen a continuación.

3.15.2.1. Purificación de los productos amplificados a partir de ADN procedente del suelo

Una vez comprobada la presencia de una banda de ADN de 0.474 kb, se empleó el producto comercial Amicon Ultra, - 0,5 ml, 100K (Ultracel, Millipore), de la siguiente manera:

- a. Insertar la columna Amicon Ultra en un microtubo de 1,5 ml.
- b. Adicionar 500 μ l del producto amplificado mediante PCR a la columna y tapanla.
- c. Centrifugar a 14,000 x g durante 10 minutos y eliminar el eluido.
- d. Lavar con 500 μ l de buffer Tris-EDTA (TE) y eliminar el eluido.
- e. Colocar la columna con la boca hacia abajo en un nuevo microtubo.
- f. Para recuperar el ADN concentrado, centrifugar por 120 s a 1000 x g
- l. El ADN ultra filtrado y concentrado se encuentra en el microtubo en un volumen de 15 a 20 μ l

3.15.2.2. Purificación de los productos amplificados a partir de ADN de las raíces de maíz

- a. Pesar un microtubo de 1,5 ml
- b. Cortar la banda correspondiente a 0.474 kb del gel de agarosa y colocarla en el microtubo. Pesar de nuevo y calcular el peso de la agarosa.
- c. Adicionar 10 μ l de solución de captura tipo-3 por cada 10 mg de peso de la agarosa

- d. Mezclar por inversión y calentar la mezcla a 60 °C hasta que se disuelva la agarosa. Observar la aparición de color amarillo-naranja pálido.
- e. Colocar dentro de un microtubo la columna GFX MicroSpin™
- f. Adicionar 600 µl de solución de captura tipo-3 a la columna GFX MicroSpin™ e incubar 60 s a temperatura ambiente.
- g. Centrifugar 30 s a 16.000 x g.
- h. Eliminar el eluído.
- i. Mantener la columna dentro del microtubo, cargar más muestra y repetir los pasos f, g y h.
- j. Adicionar 500 µl de solución de lavado tipo-1.
- k. Centrifugar 30 s a 16.000 x g.
- l. Descartar el eluído.
- m. Transferir la columna GFX MicroSpin™ a un nuevo microtubo de 1,5 ml.
- n. Adicionar 30 µl de solución de elución Tipo-4 ó 6 e incubar 60 s a temperatura ambiente.
- o. Centrifugar 60 s a 16.000 x g
- p. Recuperar el eluído donde se encuentra el ADN.
- q. Cuantificar y almacenar el ADN a -20 °C.

3.16. Preparación de las muestras para pirosecuenciación

Tanto para las muestras de suelo como de las raíces de maíz amiláceo, El ADN de cada una de las 9 submuestras/tratamiento se mezcló y se empleó para la amplificación del gen 16S rRNA. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo hasta conseguir una concentración mínima de 300 ng/µl, en un volumen total de 20 µl. Para la pirosecuenciación del ADN aislado de suelo se prepararon 2 librerías genómicas, L-SR y L-SNR, la primera formada por las muestras MT-SR, MF-SR, T-SR y M-SR, correspondientes al suelo rizosférico y la segunda por las muestras MT-SNR, MF-SNR, T-SNR, M-SNR y D, correspondientes al suelo no rizosférico (para la nomenclatura de las muestras ver tabla 3.2).

Para la pirosecuenciación del ADN procedente de los endofitos de las raíces de maíz se preparó una única librería, L-EMT, formada por una única muestra (EMT) resultante de la mezcla equimolar de tres extracciones diferentes de ADN.

Para la construcción de las librerías, las distintas muestras se mezclaron en concentraciones equimolares. Cada librería se secuenció en un octavo de placa por lo que, en teoría, se podrían obtener 150.000 lecturas.

3.17. Análisis de las secuencias procedentes de la pirosecuenciación

Las secuencias procedentes de la pirosecuenciación se trataron empleando el programa Ribosomal Database Project (RDP), Release 10 (<http://pyro.cme.msu.edu/>) (Roesch et al. 2007; Cole et al. 2009). Los cebadores, MIDs, adaptadores y aquellas otras secuencias de menos de 200 pb, o que contienen más de dos errores en la lectura de los nucleótidos, se eliminaron utilizando “*Pipeline inicial process*” de RDP (Nacke et al. 2011).

Las secuencias así cualificadas se analizaron empleando las herramientas disponibles en el RDP. “*Aligner*” permite el alineamiento de las secuencias (Nawrocki y Eddy 2007; Cole et al. 2009, Schloss 2009) y “*Complete linkage clustering*” las agrupa en Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) (Wang et al. 2007). En este trabajo las secuencias se agruparon (*clustering*) al 97% de similitud (Schloss y Handelsman 2005; Schloss y Westcott 2011). La clasificación taxonómica de las secuencias se llevó a cabo con la herramienta “*Classifier*” utilizando un umbral de confianza del 80% (Cole et al. 2005). Los índices para comparar las secuencias de las librerías L-SR y L-SNR se empleó “*Library compare*” (Cole et al. 2005; Edwards et al. 2006; Wang et al. 2007), “*Rarefaction*” para calcular las curvas de rarefacción (Roesch et al. 2007, Hale et al. 2009).

Los índices de diversidad alpha ACE (Chao y Bunge 2002), Chao1 y Shannon (Chao 1984; Chao y Lee 1992; Smith y van Belle 1984), Simpson (Simpson 1997) y Jackknife (Burnham y Overton 1979) se calcularon utilizando el programa SPADE (Chao and Shen, 2010) con los archivos generados en RDP. El índice de biodiversidad beta de Jaccard-Sørensen”se calculó mediante el comando “*Jaccard-Sorensen*” de RDP (Chao et al 2006; Youssef et al. 2010). RDP también generó los archivos para el programa MOTHUR version 1.24.1. (Schloss et al. 2009; Singleton et al. 2001; Gaidos et al. 2010), del que se empleó el comando Libshuff para el análisis comparativo de las secuencias.

4. RESULTADOS

4.1. Propiedades físico-químicas de los suelos de las chacras de Allpas

De acuerdo al Manual de Interpretación de Análisis de Suelos (Guerrero 1998), los suelos de las chacras de Allpas poseen son ligeramente ácidos, sin problemas de sales, bajo contenido en carbonatos, contenido medio en materia orgánica y elevada concentración de P y K. Según el porcentaje de arena, limo y arcilla, se trata de suelos de textura franco-arenosa. Estos datos indican que tales reúnen las condiciones edafológicas adecuadas para el crecimiento y desarrollo de los cultivos de maíz y trébol andino (Manrique 1997; Antonini et al. 2008).

Tabla 4.1 Análisis físico-químico de los suelos de las chacras maiceras de Allpas

Parámetros			Cultivos en las chacras				
			Maíz asociado con trébol	Trébol	Maíz con fertilización química	Maíz	Descanso
Análisis mecánico	Arena	%	62,00	60,00	64,00	54,00	54,00
	Limo	%	32,00	32,00	28,80	28,00	28,00
	Arcilla	%	6,00	8,00	8,00	18,00	18,00
Clase textural			Fr. A	Fr. A.	Fr. A.	Fr. A.	Fr. A.
pH (1:1)			6,34	6,04	6,27	6,33	6,10
C.E (1:1) (dS/m)			0,20	0,21	0,24	0,17	0,23
CaCO ₃ (%)			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M.O (%)			3,38	2,84	2,57	2,97	2,37
P (ppm)			23,6	28,8	32,30	15,28	14,90
K (ppm)			476	575	594,00	316,00	549,00
CIC		meq/100g	16,80	15,20	12,64	22,56	10,88
Cationes cambiables	Ca ⁺⁺		12,33	11,40	7,45	11,92	6,47
	Mg ⁺⁺		2,06	2,40	1,25	9,50	1,12
	K ⁺		1,13	1,06	0,93	0,77	0,94
	Na ⁺		0,27	0,34	0,37	0,37	0,34
	Al ⁺³ H ⁺		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Suma de cationes			15,80	15,20	10,00	22,56	8,86
Suma de bases			15,80	15,20	10,00	22,56	8,86
% Saturación de bases			94,00	100,00	79,00	100,00	81

Fr. A. = Franco Arenoso

4.2. Análisis foliar del trébol andino (*M. hispida* G).

El contenido en macro y micronutrientes de las hojas y tallos de trébol andino se presenta en la Tabla 4.2. Mientras que las concentraciones de N, P, K, S, Mg, Ca, Fe Mn, B y Na se encuentran en el rango típico para estos elementos, los valores de Cu y Zn son inferiores a las concentraciones normales (5-20 ppm para el Cu y 25-150 ppm para el Zn) (Piaggese 2004; Barbazán 1998).

Tabla 4. 2. Análisis foliar del trébol andino (*M. hispida* G.) crecido en una chacra maicera cultivada con maíz asociado a trébol andino.

Parámetro	Valor
Materia seca (%)	14,03
N (%)	4,40
P (%)	0,44
K (%)	3,18
Ca (%)	1,71
Mg (%)	0,30
S (%)	0,14
Na (%)	0,06
Zn (ppm)	24
Cu (ppm)	4
Mn (ppm)	66
Fe (ppm)	134
B (ppm)	145

4.3. Identificación de endosimbiontes aislados de nódulos de trébol andino

Después de la incubación en medio YEM del extracto obtenido de los nódulos de trébol andino se obtuvieron 54 UFCs morfológicamente diferentes. La huella genética (fingerprint) de cada una de las cepas obtenida mediante REP-PCR permitió la construcción, utilizando el programa informático InfoQuest FP, de un dendrograma que mostró, para valores de identidad superiores al 90%, que las cepas se distribuyeron en 31 grupos (Figura 4.1).

Después de la amplificación y secuenciación parcial del gen 16 rRNA de cada una de las cepas representativas de cada grupo REP, la búsqueda mediante el programa BLASTN de secuencias homólogas depositadas en los Bancos de Datos estableció que sólo 8 de las 31 cepas (25%) son miembros del orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria (Tabla 4.3 y Figura 4.2). El género más abundante fue *Ensifer* (75%) (previamente *Sinorhizobium*), seguido de *Rhizobium* y *Kaistia*, cada uno con el 12,5%. Se detectó, además, la presencia de bacterias no incluidas en el orden Rhizobiales, que representaron el 75% del total de cepas aisladas (Tabla 4.3 y Figura 4.2). De ellas, el 42% corresponde al género *Pseudomonas*, el 7% a cada uno de los géneros *Rheinheimera*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*, y el 3% a cada uno de los géneros *Achromobacter*, *Duganella*, *Microbacterium* y *Sphingopyxis* (Tabla 4.3 y Figura 4.2). Estas cepas no ha sido objeto de este estudio en nuestro trabajo.

Figura 4.2. Representación gráfica del porcentaje de bacterias aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida* G.).

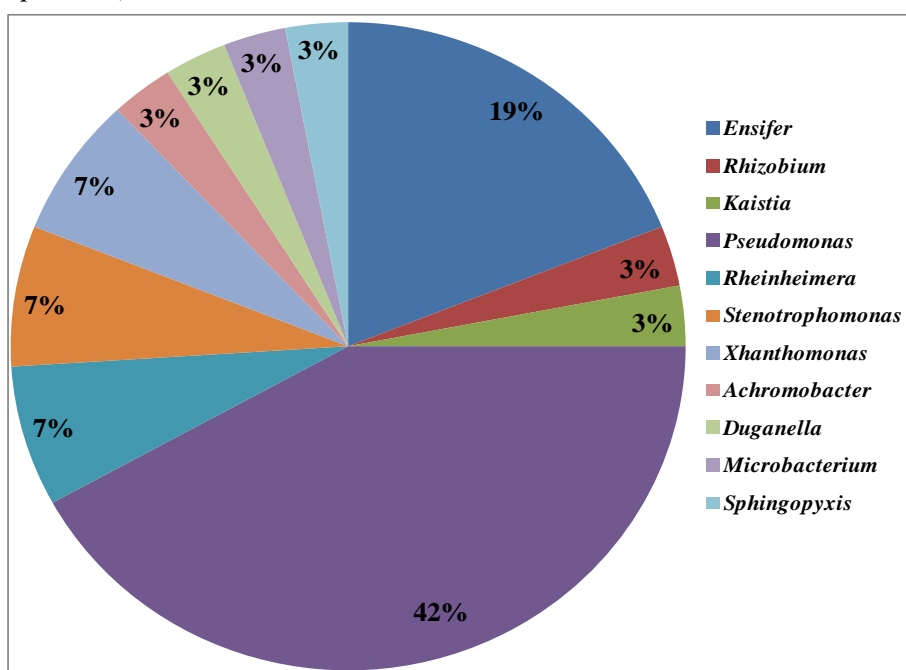


Figura 4.1. Dendrograma normalizado correspondiente a la REP-PCR de las cepas aisladas de los nódulos de *M. hispida* G.

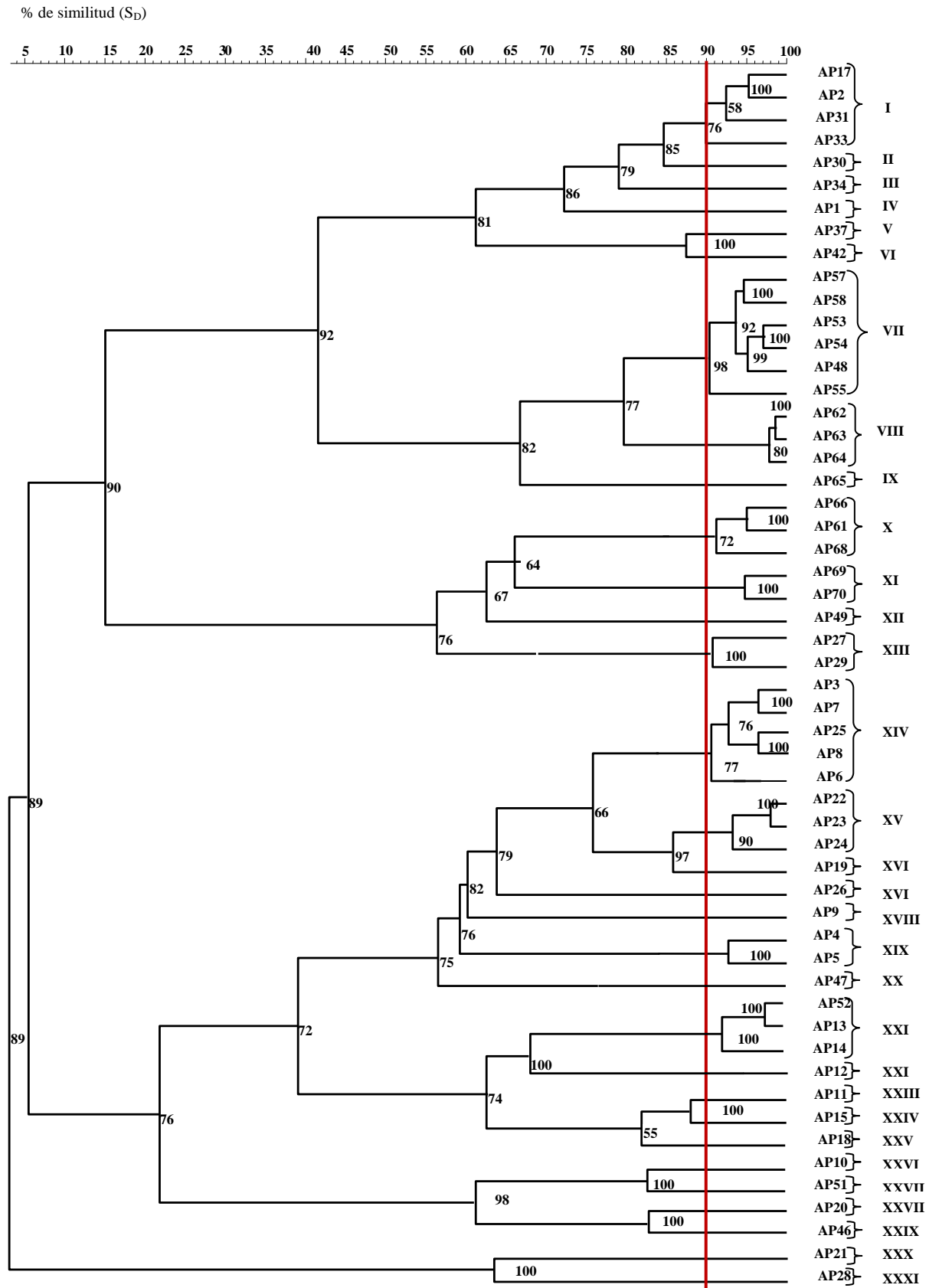


Tabla 4.3. Identificación de cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida* G.). Las cepas en negrita indican las cepas representativas de cada grupo.

Grupo REP	Cepas*	Especie filogenética más cercana	Familia	Orden	Clase
I	AP17, AP2 , AP31, AP33	<i>Kaistia granuli</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
II	AP30	<i>Stenotrophomonas</i> spp ²	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Gammaproteobacteria
III	AP34	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
IV	AP1	<i>Sinorhizobium medicae</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
V	AP37	<i>Sinorhizobium medicae</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
VI	AP42	<i>Xanthomonas</i> spp ²	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Gammaproteobacteria
VII	AP48 , AP53, AP54, AP55, AP57, AP58	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
VIII	AP62, AP63, AP64	<i>Microbacterium</i> spp ²	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
IX	AP65	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
X	AP61 , AP66, AP68	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XI	AP69, AP70	<i>Sinorhizobium medicae</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
XII	AP49	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XIII	AP27, AP29	<i>Sinorhizobium medicae</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
XIV	AP3, AP6, AP7 , AP8, AP25	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XV	AP22, AP23, AP24	<i>Achromobacter</i> spp ²	Alcaligenaceae	Burkholderiales	Betaproteobacteria
XVI	AP19	<i>Xanthomonas</i> spp ²	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Gammaproteobacteria
XVII	AP26	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XVIII	AP9	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XIX	AP4 AP5	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XX	AP47	<i>Duganella</i> spp. ²	Oxalobacteraceae	Burkholderiales	Betaproteobacteria
XXI	AP13, AP14 , AP52	<i>Pseudomonas</i> spp ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XXII	AP12	<i>Rhizobium giardinii</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
XXIII	AP11	<i>Rheinheimera</i> spp ²	Chromatiaceae	Chromatiales	Gammaproteobacteria
XXIV	AP15	<i>Sinorhizobium medicae</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria
XXV	AP18	<i>Stenotrophomonas</i> spp ²	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Gammaproteobacteria

XXVI	AP10	<i>Rheinheimera</i> spp. ²	Chromatiaceae	Chromatiales	Gammaproteobacteria
XXVII	AP51	<i>Pseudomonas</i> spp. ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XXVIII	AP20	<i>Pseudomonas</i> spp. ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XXIX	AP46	<i>Sphingopyxis</i> spp. ²	Sphingomonadaceae	Sphingomonadales	Alphaproteobacteria
XXX	AP21	<i>Pseudomonas</i> spp. ²	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria
XXXI	AP28	<i>Sinorhizobium medicae</i> ¹	Rhizobiaceae	Rhizobiales	Alphaproteobacteria

*AP, Acobamba-Perú

¹La secuenciación del gen 16S rRNA se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos fD1 y rD1.

²La secuenciación del gen 16S rRNA se llevó a cabo empleando sólo el oligonucleótido fD1

La construcción de un árbol filogenético utilizando las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas seleccionadas en cada grupo REP-PCR y de las cepas tipo de diversos géneros del orden Rhizobiales demostró que las cepas AP1, AP15, AP28, AP29, AP37 y AP70 se agruparon con *E. medicae* A321^T, la cepa AP12 lo hizo con *R. giardinii* H152^T y la cepa AP2 con *K. granuli* Ko04^T (Figura 4.3). Igualmente, un árbol filogenético utilizando las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas AP1, AP15, AP28, AP29, AP37 y AP70 y las de diversas especies tipo del género *Ensifer* demostró que se agrupan con *E. medicae* A321^T (Figura 4.4). El alineamiento entre las cepas aisladas de *M. hispida* y las especies tipo de *Ensifer* mostró que las cepas AP1, AP15, AP28, AP29, AP37 y AP70 tienen un 99,92%, 99,56%, 99,85%, 98,43%, 100% y 99,07% de similitud, respectivamente, con *E. medicae* A321^T (Tabla 4.4). Los alineamientos de las cepas AP12 y AP2 indicaron que presentan una similitud del 99,0% y del 99,04%, respectivamente, con *R. giardinii* H152^T (Tabla 4.5) y *K. granuli* Ko04^T (Tabla 4.6).

Para continuar su caracterización, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes *atpD*, *glnII* y *recA* de las cepas aisladas de nódulos de *M. hispida*. La amplificación del gen *atpD* de cada cepa produjo 1 fragmento de ADN de, aproximadamente, 0.550 kb cuya secuencia de nucleótidos fue idéntica para cada una de las seis cepas, y mostró 100% de identidad con *E. medicae* A321^T (Tabla 4.7). La construcción de un árbol filogenético utilizando las secuencias del gen *atpD* de las cepas AP1, AP15, AP28, AP29, AP37 y AP70 y las de diversas especies tipo del género *Ensifer* demostró que se agrupan con *E. medicae* A321^T (Figura 4.5). La amplificación del gen *glnII* produjo 1 fragmento de ADN de aproximadamente 0.600 kb cuya secuencia de nucleótidos fue idéntica (100% de similitud) entre cada una de las cepas AP1, AP15, AP28, AP29, AP37 y AP70 (Tabla 4.8). La construcción del correspondiente árbol filogenético mostró que las secuencias de las 6 cepas se agrupan con la del gen *glnII* de *E. medicae* A321^T (Figura 4.6). La amplificación del gen *recA* resultó en un fragmento de ADN de aproximadamente 0.700 kb, cuya secuencia (100% de similitud) fue idéntica entre las 6 cepas y la del gen *recA* de *E. medicae* A321^T (Tabla 4.9). La construcción del correspondiente árbol filogenético mostró que las 6 cepas se agrupan con *E. medicae* A321^T (Figura 4.7).

Figura 4.3. Árbol filogenético, basado en las secuencias parciales (1.267 pares de bases) del gen 16S rRNA, de las cepas aisladas de nódulos de *M. hispida*. Se realizaron 1000 bootstraps y los valores inferiores al 70% no se muestran. Entre paréntesis se indican los números de acceso de cada cepa. La barra representa una sustitución de un nucleótido por cada 100 nucleótidos. El árbol está enraizado en *Ralstonia pickettii* LMG 5942^T.

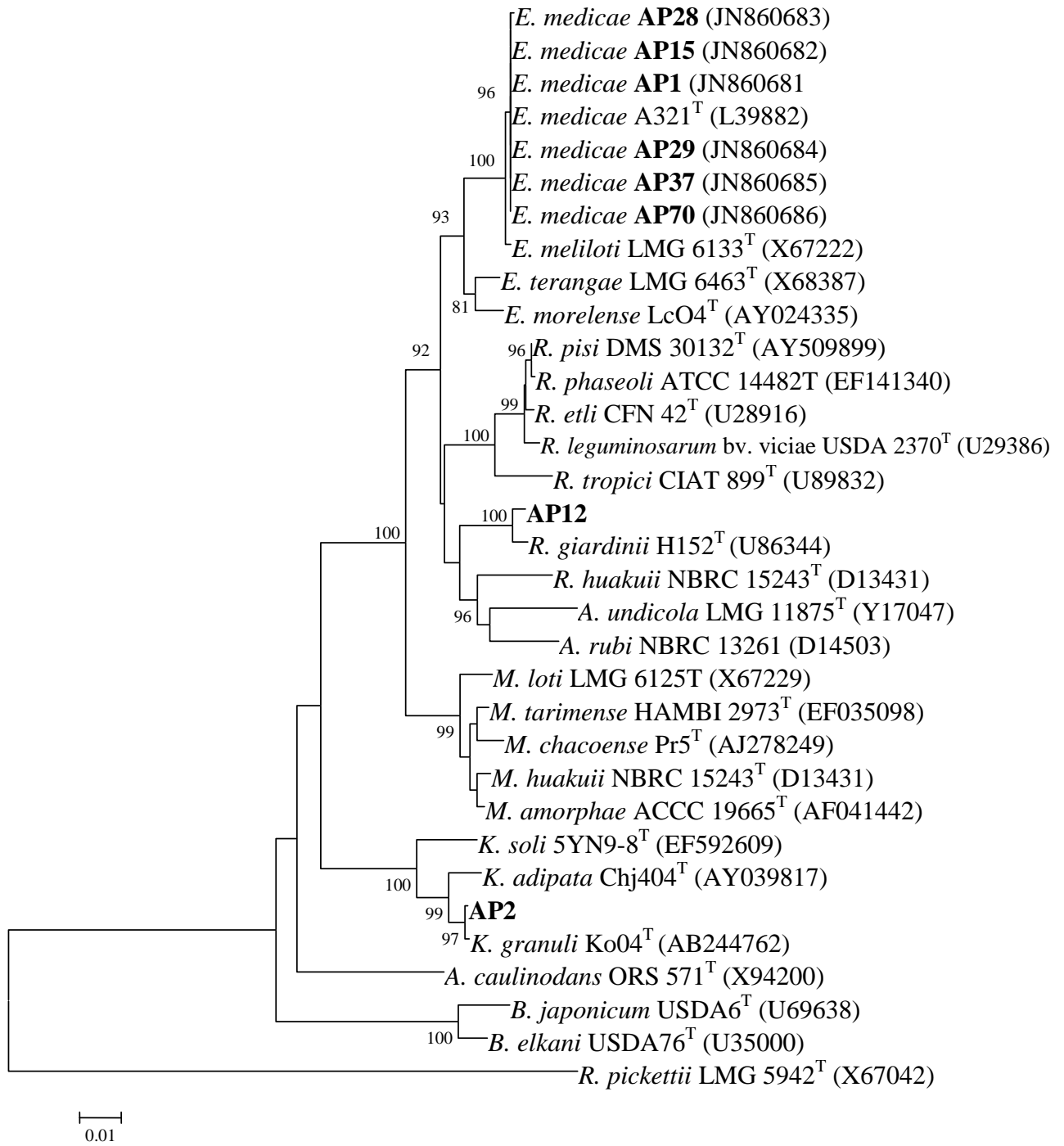


Figura 4.4. Árbol filogenético, basado en las secuencias parciales (1.267 pares de bases) del gen 16S rRNA, de las cepas de *Ensifer* aisladas de nódulos de *M. hispida* y las de las cepas tipo del mismo género. Se realizaron 1000 bootstraps y los valores inferiores al 70% no se muestran. Entre paréntesis se indican los números de acceso de cada cepa. La barra representa una sustitución de un nucleótido por cada 100 nucleótidos. El árbol está enraizado en *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T.

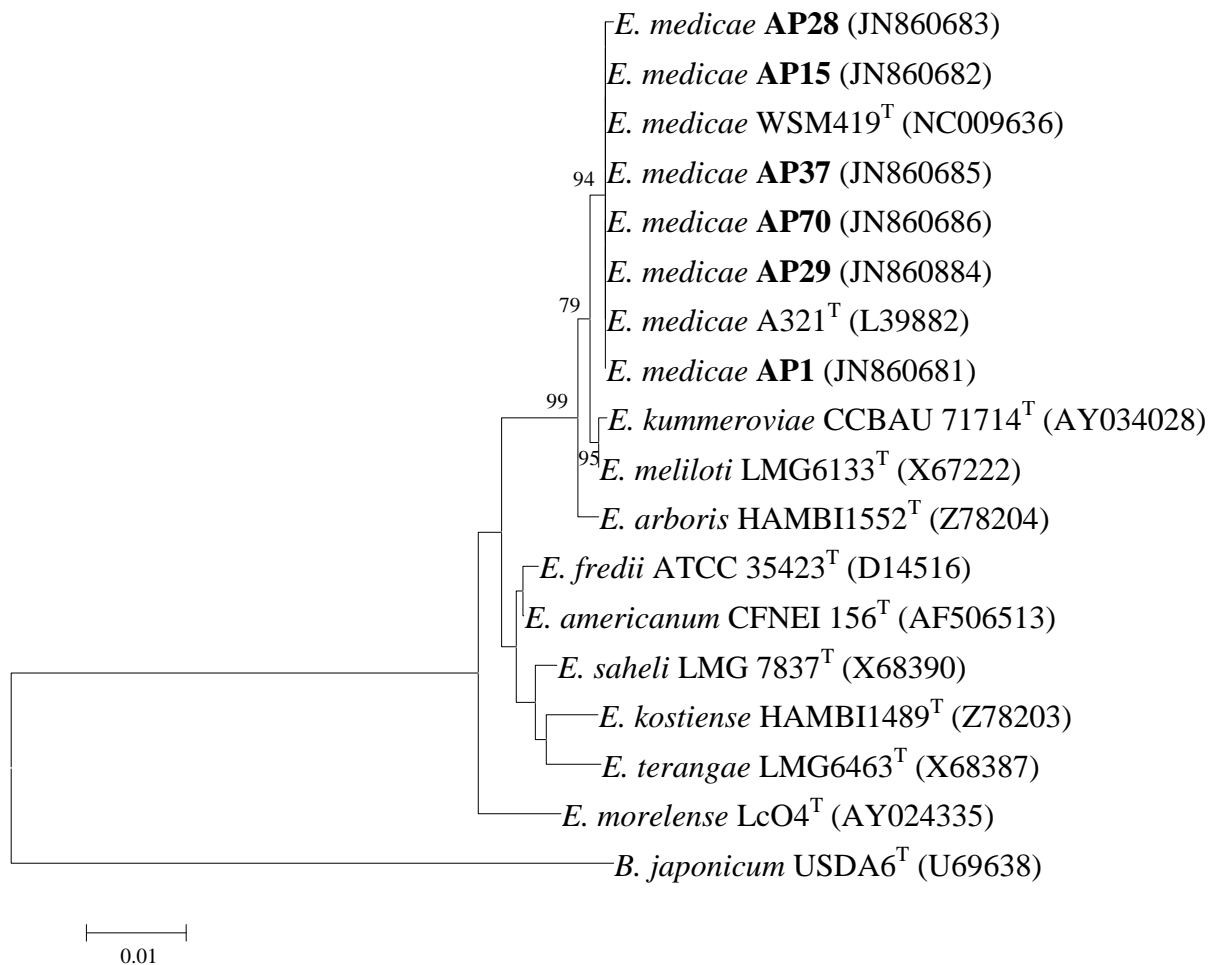


Tabla 4.4. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y especies tipo del género *Ensifer*

	<i>E. medicae</i> AP1	<i>E. medicae</i> AP29	<i>E. medicae</i> AP70	<i>E. medicae</i> AP28	<i>E. medicae</i> AP15	<i>E. medicae</i> A321 ^T	<i>E. medicae</i> AP37	<i>E. arboris</i> HAMBI 1552 ^T	<i>E. meliloti</i> LMG 6133 ^T	<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	<i>E. terangae</i> LMG 6463 ^T	<i>E. kostiense</i> HAMBI 1489 ^T	<i>E. fredii</i> ATCC 35423 ^T	<i>E. morelense</i> LcO4 ^T
<i>E. medicae</i> AP1	---	1/1315	1/1315	2/1315	1/1315	1/1315	0/1241	7/1315	5/1315	22/1315	30/1315	28/1315	19/1315	29/1315
<i>E. medicae</i> AP29	99.92	---	11/1394	2/1335	2/1379	22/1403	12/1266	28/1403	26/1403	49/1403	57/1403	49/1403	40/1400	50/1403
<i>E. medicae</i> AP70	99.92	99.21	---	2/1335	4/1379	13/1395	11/1273	23/1401	21/1401	44/1401	52/1401	44/1401	35/1398	45/1401
<i>E. medicae</i> AP28	99.85	99.85	99.85	---	1/1335	2/1335	2/1250	8/1335	6/1335	23/1335	31/1335	29/1335	20/1335	30/1335
<i>E. medicae</i> AP15	99.92	99.85	99.71	99.93	---	6/1379	6/1259	12/1379	10/1379	33/1379	41/1379	33/1379	24/1376	34/1379
<i>E. medicae</i> A321 ^T	99.92	98.43	99.07	99.85	99.56	---	0/1267	6/1423	4/1423	27/1423	35/1423	27/1423	18/1420	28/1423
<i>E. medicae</i> AP37	100.00	99.05	99.14	99.84	99.52	100.00	---	11/1280	8/1280	25/1280	31/1280	30/1280	22/1280	30/1280
<i>E. arboris</i> HAMBI1552 ^T	99.47	98.00	98.36	99.40	99.13	99.58	99.14	---	6/1437	23/1437	33/1437	23/1437	18/1434	31/1437
<i>E. meliloti</i> LMG 6133 ^T	99.62	98.15	98.50	99.55	99.27	99.72	99.38	99.58	---	23/1437	35/1437	25/1437	16/1434	28/1437
<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	98.33	96.51	96.86	98.28	97.61	98.10	98.05	98.40	98.40	---	15/1437	20/1437	11/1434	30/1437
<i>E. terangae</i> LMG 6463 ^T	97.72	95.94	96.29	97.68	97.03	97.54	97.58	97.70	97.56	98.96	---	22/1437	23/1434	30/1437
<i>E. kostiense</i> HAMBI 1489 ^T	97.87	96.51	96.86	97.83	97.61	98.10	97.66	98.40	98.26	98.61	98.47	---	13/1434	31/1437
<i>E. fredii</i> ATCC 35423 ^T	98.56	97.14	97.50	98.50	98.26	98.73	98.28	98.74	98.88	99.23	98.40	99.09	---	22/1472
<i>E. morelense</i> LcO4 ^T	97.79	96.44	96.79	97.75	97.53	98.03	97.66	97.84	98.05	97.91	97.91	97.84	98.51	---

a. Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

b. Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos.

Tabla 4.5. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y diversas especies tipo del género *Rhizobium*.

	<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	<i>R. giardinii</i> H152 ^T	<i>R. huautlense</i> SO2 ^T	<i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T	<i>R. galegae</i> HAMBI 540 ^T	<i>R. gallicum</i> R602sp ^T	<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae USDA 2370 ^T	<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	AP12
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	---	61/1470	73/1459	54/1417	78/1431	55/1470	41/1454	33/1419	15/1469	66/1401
<i>R. giardinii</i> H152 ^T	95.85	---	57/1461	65/1419	63/1433	63/1474	63/1456	62/1421	51/1472	14/1407 ^b
<i>R. huautlense</i> SO2 ^T	95.00	96.10	---	42/1419	8/1433	44/1461	58/1454	56/1421	63/1460	63/1403
<i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T	96.19	95.42	97.04	---	46/1419	9/1419	26/1419	35/1419 ^b	49/1418	71/1402
<i>R. galegae</i> HAMBI 540 ^T	94.55	95.60	99.44	96.76	---	48/1433	61/1433	60/1419	70/1432	69/1403
<i>R. gallicum</i> R602sp ^T	96.26	95.73	96.99	99.37	96.65	---	28/1456	36/1421	47/1472	72/1404
<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	97.18	95.67	96.01	98.17	95.74	98.08	---	17/1421	32/1456	68/1403
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae USDA 2370 ^T	97.67	95.64	96.06	97.53	95.77	97.47	98.80	---	28/1420	68/1402
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	98.98	96.54	95.68	96.54	95.11	96.81	97.80	98.03	---	57/1402
AP12	95.29	99.00^a	95.51	94.94	95.08	94.87	95.15	95.15	95.93	---

a. Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

b. Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos.

Tabla 4.6. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen 16S rRNA de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y diversas especies tipo del género *K.*

	<i>K. adipata</i> Chj404 ^T	<i>K. soli</i> 5Yn9-8 ^T	<i>K. granuli</i> Ko04 ^T	AP2
<i>K. adipata</i> Chj404 ^T	---	50/1388	33/1398	28/1346
<i>K. soli</i> 5Yn9-8 ^T	96.40	---	41/1390	43/1345
<i>K. granuli</i> Ko04 ^T	97.64	97.05	---	13/1355 ^b
AP2	97.92	96.80	99.04^a	---

^{a.} Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

^{b.} Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos.

Tabla 4.7. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen *atpD* de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y diversas especies tipo del género *Ensifer*.

	<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T	<i>E. terangae</i> LMG 7834 ^T	<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	<i>E. medicae</i> A321 ^T	<i>E. medicae</i> WSM419	<i>E. medicae</i> AP37	<i>E. medicae</i> AP70	<i>E. medicae</i> AP29	<i>E. medicae</i> AP28	<i>E. medicae</i> AP15	<i>E. medicae</i> AP1	<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>E. morelense</i> LMG 1331 ^T
<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	---	35/443	32/443	33/443	36/442	37/443	37/443	37/443	37/443	37/443	37/443	37/443	41/442	38/443
<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T	92.10	---	36/443	46/474	44/442	47/474	47/474	47/474	47/474	47/474	47/474	47/474	41/442	52/474
<i>E. terangae</i> LMG 7834 ^T	92.78	91.87	---	35/443	38/442	39/443	39/443	39/443	39/443	39/443	39/443	39/443	36/442	43/443
<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	92.55	90.30	92.10	---	34/442	37/474	37/474	37/474	37/474	37/474	37/474	37/474	41/442	46/474
<i>E. medicae</i> A321 ^T	91.86	90.05	91.40	92.31	---	0/442	0/442	0/442	0/442	0/442	0/442	0/442	42/441	48/442
<i>E. medicae</i> WSM419 ^T	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	---	1/488	1/488	1/488	1/488	1/488	1/488	42/442	53/474
<i>E. medicae</i> AP37	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	99.80	---	0/489	0/489	0/489	0/489	0/489	42/442	53/474
<i>E. medicae</i> AP70	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	99.80	100.00	---	0/492	0/489	0/492	0/489	42/442	53/474
<i>E. medicae</i> AP29	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	99.80	100.00	100.00	---	0/489	0/492	0/489	42/442	53/474
<i>E. medicae</i> AP28	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	99.80	100.00	100.00	100.00	---	0/489	0/489	42/442	53/474
<i>E. medicae</i> AP15	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	99.80	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/489	42/442	53/474
<i>E. medicae</i> AP1	91.65	90.08	91.20	92.19	100.00	99.80	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	42/442	53/474
<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	90.72	90.72	91.86	90.72	90.48	90.50	90.50	90.50	90.50	90.50	90.50	90.50	---	46/442
<i>E. morelense</i> LMG 21331 ^T	91.42	89.03	90.29	90.30	89.14	88.82	88.82	88.82	88.82	88.82	88.82	88.82	89.59	---

a. Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

b. Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos.

Figura 4.5. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales (142 aminoácidos) del gen *atpD* de las cepas de *E.* aisladas de nódulos de *M. hispida* y las de diversas cepas tipo del mismo género. Se realizaron 1000 bootstraps y los valores inferiores al 70% no se muestran. Entre paréntesis se indican los números de acceso de cada cepa. La barra representa una sustitución de un aminoácido por cada 100 aminoácidos. El árbol está enraizado en *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T. El árbol está enraizado en *B. japonicum* USDA6^T.

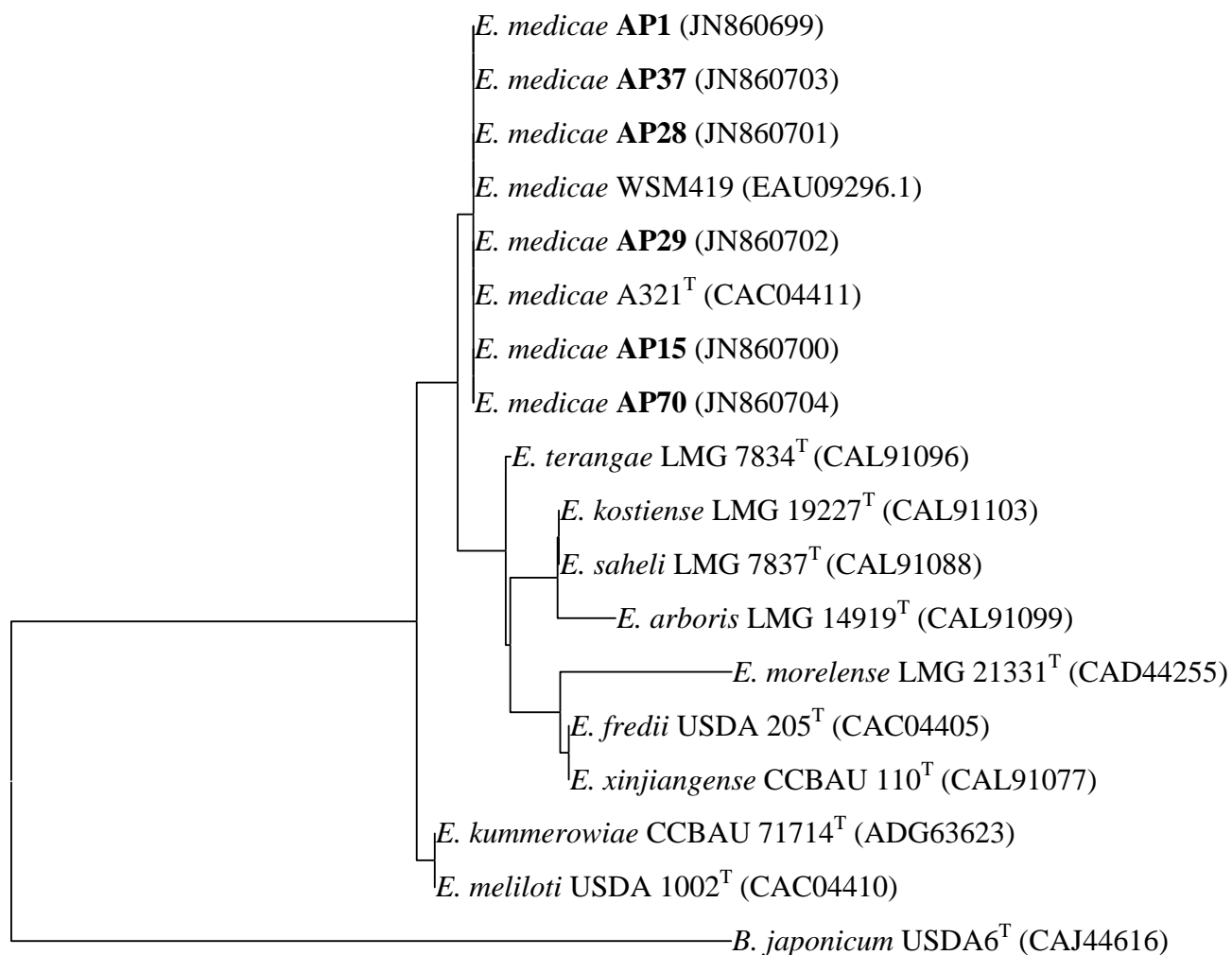


Tabla 4.8. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen *glnII* de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y diversas especies tipo del género *Ensifer*.

	<i>E. medicae</i> AP1	<i>E. medicae</i> A321 ^T	<i>E. medicae</i> WSM419	<i>E. medicae</i> AP70	<i>E. medicae</i> AP15	<i>E. medicae</i> AP28	<i>E. medicae</i> AP37	<i>E. medicae</i> AP29	<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>E. terangae</i> LMG 7834 ^T	<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	<i>E. kostiense</i> LMG 19227 ^T	<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	<i>E. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T
<i>E. medicae</i> AP1	---	0/577	0/577	0/577	0/577	0/577	0/577	0/577	67/577	72/577	66/577	64/559	38/501	38/555	46/559
<i>E. medicae</i> A321 ^T	100.00	---	0/577	0/577	0/577	0/577	0/577	0/577	103/828	109/828	109/827	64/559	38/501	38/555	46/559
<i>E. medicae</i> WSM419	100.00	100.00	---	0/577	0/577	0/577	0/577	0/577	67/577	72/577	66/577	64/559	38/501	38/555	46/559
<i>E. medicae</i> AP70	100.00	100.00	100.00	---	0/577	0/577	0/577	0/577	67/577	72/577	66/577	64/559	38/501	38/555	46/559
<i>E. medicae</i> AP15	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/584	0/581	0/577	67/577	72/577	66/577	65/568	39/510	38/564	46/568
<i>E. medicae</i> AP28	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/581	0/577	67/577	72/577	66/577	65/566	39/508	38/562	46/566
<i>E. medicae</i> AP37	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/577	67/577	72/577	66/577	65/563	39/505	38/559	46/563
<i>E. medicae</i> AP29	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	67/577	72/577	66/577	64/559	38/501	38/555	46/559
<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	88.39	87.56	88.39	88.39	88.39	88.39	88.39	88.39	---	64/828	46/827	41/559	47/501	49/555	61/559
<i>E. terangae</i> LMG 7834 ^T	87.52	86.84	87.52	87.52	87.52	87.52	87.52	87.52	92.27	---	51/827	40/559	56/501	59/555	63/559
<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	88.56	86.82	88.56	88.56	88.56	88.56	88.56	88.56	94.44	93.83	---	33/559	46/501	51/555	61/559
<i>E. kostiense</i> LMG 19227 ^T	88.55	88.55	88.55	88.55	88.56	88.52	88.45	88.55	92.67	92.84	94.10	---	56/540	60/615	65/619
<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	92.42	92.42	92.42	92.42	92.35	92.32	92.28	92.42	90.62	88.82	90.82	89.63	---	4/540	41/540
<i>E. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	93.15	93.15	93.15	93.15	93.26	93.24	93.20	93.15	91.17	89.37	90.81	90.24	99.26	---	38/615
<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T	91.77	91.77	91.77	91.77	91.90	91.87	91.83	91.77	89.09	88.73	89.09	89.50	92.41	93.82	---

a. Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

b. Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos.

Figura 4.6. Árbol filogenético, basado en las secuencias parciales (168 aminoácidos) del gen *glnII*, de las cepas de *E.* aisladas de nódulos de *M. hispida* y las de las cepas tipo del mismo género. Se realizaron 1000 bootstraps y los valores inferiores al 70% no se muestran. Entre paréntesis se indican los números de acceso de cada cepa. La barra representa una sustitución de un aminoácido por cada 100 aminoácidos. El árbol está enraizado en *B. japonicum* USDA6^T

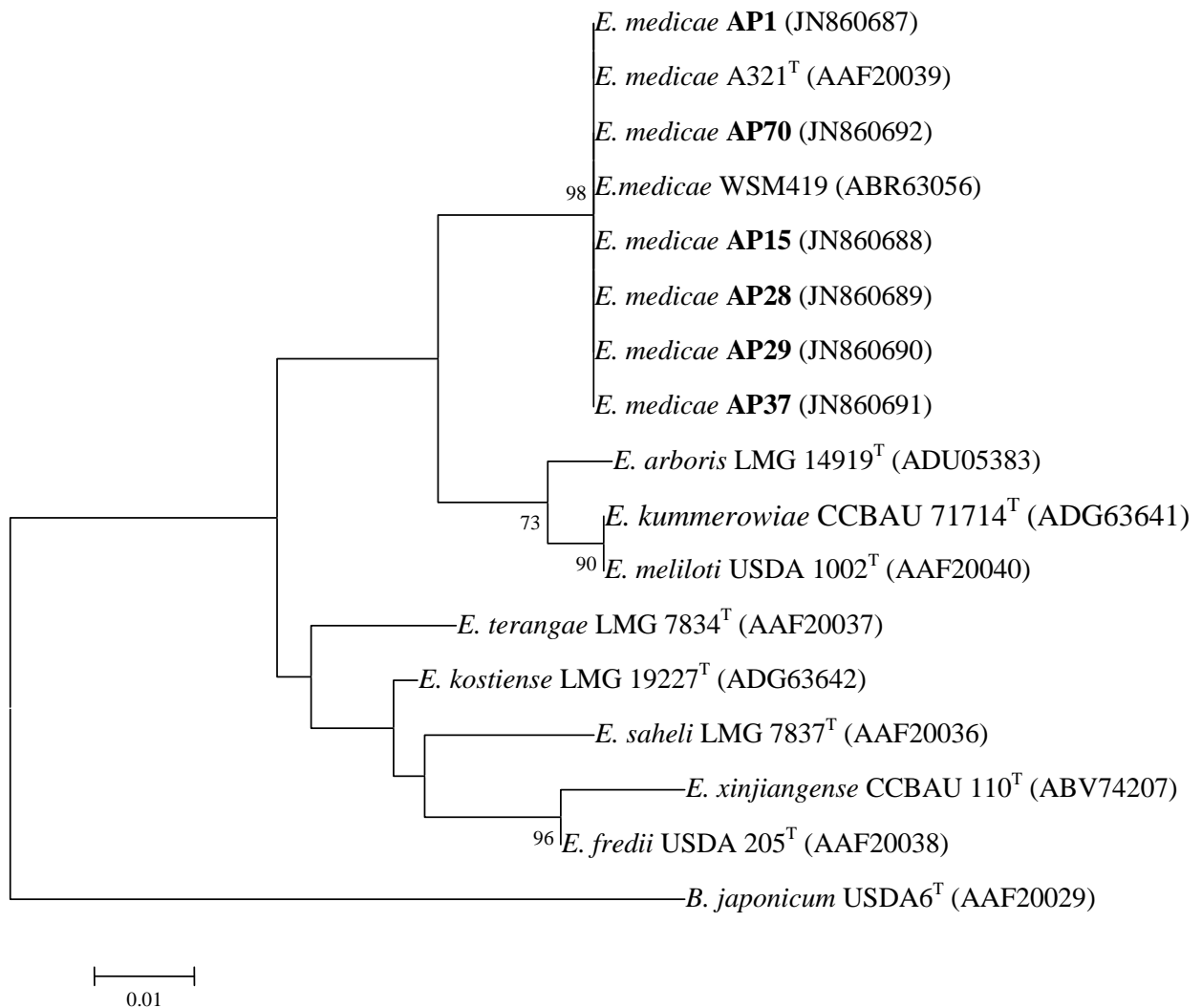


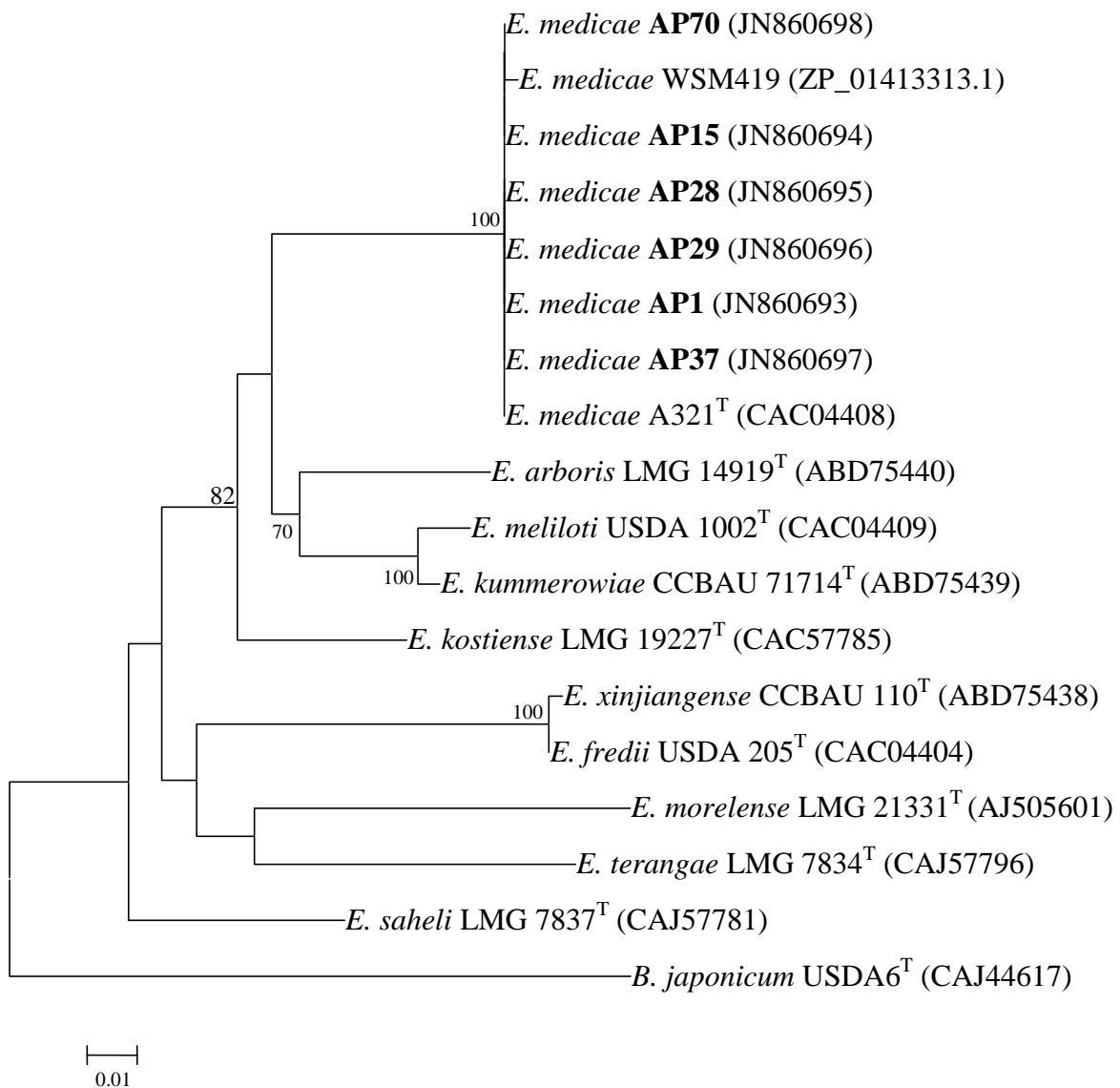
Tabla 4.9. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen *recA* de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y diversas especies tipo del género *Ensifer*

	<i>E. medicae</i> AP37	<i>E. medicae</i> WSM419	<i>E. medicae</i> AP28	<i>E. medicae</i> AP1	<i>E. medicae</i> AP29	<i>E. medicae</i> AP15	<i>E. medicae</i> AP70	<i>E. medicae</i> A321 ^T	<i>E. morelense</i> LMG 2133 ^T	<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T	<i>E. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>E. kostiense</i> LMG 19227 ^T	<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T
<i>E. medicae</i> Ap37	---	1/446	0/446	0/446	0/446	0/446	0/446	0/438	63/444	35/408	31/408	36/444	55/438	32/408	48/438
<i>E. medicae</i> WSM419	99.78	---	1/446	1/446	1/446	1/446	1/446	1/438	64/444	36/408	32/408	37/444	56/438	33/408	49/438
<i>E. medicae</i> AP28	100.00	99.78	---	0/446	0/446	0/446	0/446	0/438	63/444	35/408	31/408	36/444	55/438	32/408	48/438
<i>E. medicae</i> AP1	100.00	99.78	100.00	---	0/446	0/446	0/446	0/438	63/444	35/408	31/408	36/444	55/438	32/408	48/438
<i>E. medicae</i> AP29	100.00	99.78	100.00	100.00	---	0/454	0/454	0/446	65/452	35/416	31/416	36/452	55/446	33/416	48/446
<i>E. medicae</i> AP15	100.00	99.78	100.00	100.00	100.00	---	0/454	0/446	65/452	35/416	31/416	36/452	55/446	33/416	48/446
<i>E. medicae</i> AP70	100.00	99.78	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/446	65/452	35/416	31/416	36/452	55/446	33/416	48/446
<i>E. medicae</i> A321 ^T	100.00	99.77	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	78/533	39/450	36/450	44/533	64/533	39/450	56/533
<i>E. morelense</i> 2133 ^T	85.81	85.59	85.81	85.81	85.62	85.62	85.62	85.37	---	68/450	62/450	68/550	73/533	63/450	66/533
<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T	91.42	91.18	91.42	91.42	91.59	91.59	91.59	91.33	84.89	---	26/450	30/450	56/450	45/450	40/450
<i>E. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	92.40	92.16	92.40	92.40	92.55	92.55	92.55	92.00	86.22	94.22	---	6/450	56/450	38/450	40/450
<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	91.89	91.67	91.89	91.89	92.04	92.04	92.04	91.74	87.64	93.33	98.67	---	62/533	38/450	45/533
<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	87.44	87.21	87.44	87.44	87.67	87.67	87.67	87.99	86.30	87.56	87.56	88.37	---	51/450	50/533
<i>E. kostiense</i> LMG 19227 ^T	92.16	91.91	92.16	92.16	92.07	92.07	92.07	91.33	86.00	90.00	91.56	91.56	88.67	---	38/450
<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	89.04	88.81	89.04	89.04	89.24	89.24	89.24	89.49	87.62	91.11	91.11	91.56	90.62	91.56	---

a. Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

b. Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos.

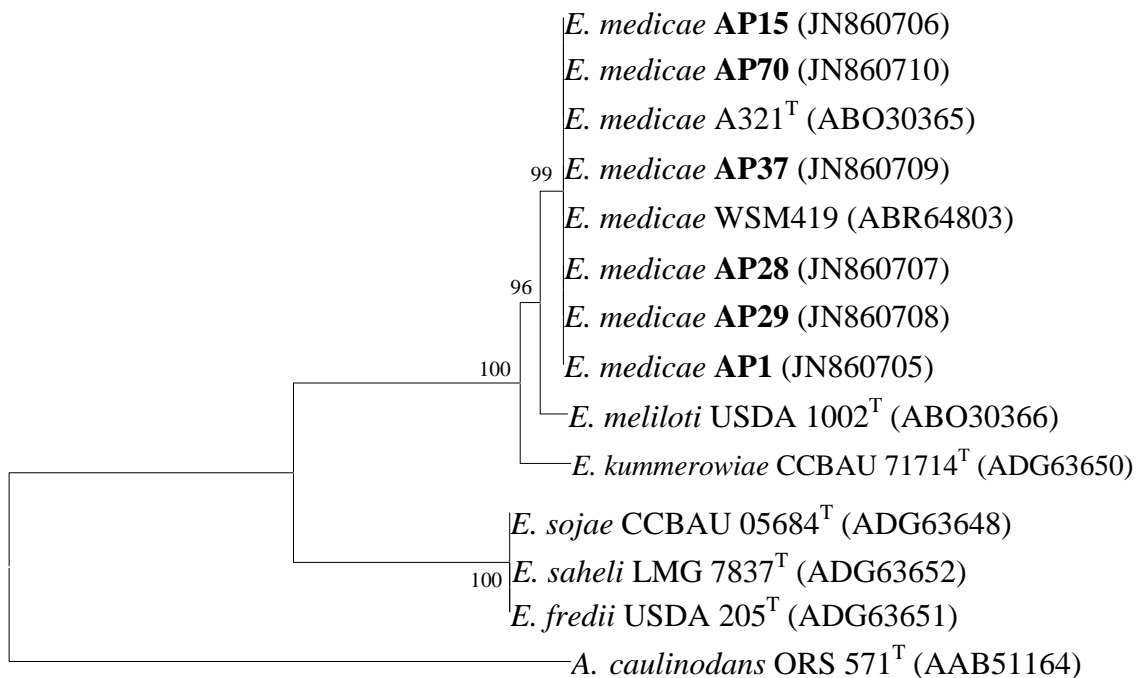
Figura 4.7. Árbol filogenético, basado en las secuencias parciales (148 aminoácidos) del gen *recA*, de las cepas de *E. aisladas de nódulos de M. hispida* y las de las cepas tipo del mismo género. Se realizaron 1000 bootstraps y los valores inferiores al 70% no se muestran. Entre paréntesis se indican los números de acceso de cada cepa. La barra representa una sustitución de un aminoácido por cada 100 aminoácidos. El árbol está enraizado en *B. japonicum* USDA6^T.



Finalmente, la identificación de las cepas aisladas de nódulos de *M. hispida* se completó mediante la amplificación y secuenciación del gen de nodulación *nodC*. Su amplificación resultó en 1 fragmento de ADN de aproximadamente 0.900 kb cuya secuencia de nucleótidos

fue idéntica (100% de similitud) entre cada una de las seis cepas AP1, AP15, AP28, AP29, AP37 y AP70 y la de *E. medicae* A321^T (Tabla 4.10). La construcción de un árbol filogenético utilizando las secuencias del gen *nodC* de dichas cepas y las de diversas especies tipo del género *E.* demostró que se agrupan con *E. medicae* A321^T (Figura 4.8).

Figura 4.8. Árbol filogenético, basado en las secuencias parciales (276 aminoácidos) del gen *recA*, de las cepas de *E.* aisladas de nódulos de *M. hispida* y las de las cepas tipo del mismo género. Se realizaron 1000 bootstraps y los valores inferiores al 70% no se muestran. Entre paréntesis se indican los números de acceso de cada cepa. La barra representa una sustitución de un aminoácido por cada 100 aminoácidos. El árbol está enraizado en *Azorhizobium caulinodans* ORS 571^T.




 0.01

Tabla 4.10. Valores de similitud entre las secuencias alineadas del gen *nodC* de las cepas aisladas de nódulos de trébol andino (*M. hispida*) y diversas especies tipo del género *Ensifer*

	<i>E. medicae</i> AP29	<i>E. medicae</i> AP37	<i>E. medicae</i> AP15	<i>E. medicae</i> AP28	<i>E. medicae</i> AP70	<i>E. medicae</i> AP1	<i>E. medicae</i> A321 ^T	<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	<i>E. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T
<i>E. medicae</i> AP29	---	0/873	0/873	0/873	0/873	0/873	0/873	26/873	28/831	202/828	203/829	182/736
<i>E. medicae</i> AP37	100.00	---	0/873	0/873	0/873	0/873	0/873	26/873	28/831	202/828	203/829	182/736
<i>E. medicae</i> AP15	100.00	100.00	---	0/873	0/873	0/873	0/873	26/873	28/831	202/828	203/829	182/736
<i>E. medicae</i> AP28	100.00	100.00	100.00	---	0/882	0/882	0/882	26/882	28/831	202/828	203/829	182/736
<i>E. medicae</i> AP70	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/882	0/882	26/882	28/831	202/828	203/829	182/736
<i>E. medicae</i> AP1	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/882	26/882	28/831	202/828	203/829	182/736
<i>E. medicae</i> A321 ^T	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	36/1281	28/836	203/830	204/831	182/736
<i>E. meliloti</i> USDA 1002 ^T	97.02	97.02	97.02	97.05	97.05	97.05	97.19	---	37/836	210/830	211/831	181/736
<i>E. kummerowiae</i> CCBAU 71714 ^T	96.63	96.63	96.63	96.63	96.63	96.63	96.65	95.57	---	206/830	206/831	183/736
<i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T	75.60	75.60	75.60	75.60	75.60	75.60	75.54	74.70	75.18	---	0/830	148/736
<i>E. fredii</i> USDA 205 ^T	75.51	75.51	75.51	75.51	75.51	75.51	75.45	74.61	75.21	100.00	---	148/736
<i>E. arboris</i> LMG 14919 ^T	75.27	75.27	75.27	75.27	75.27	75.27	75.27	75.41	75.14	79.89	79.89	---

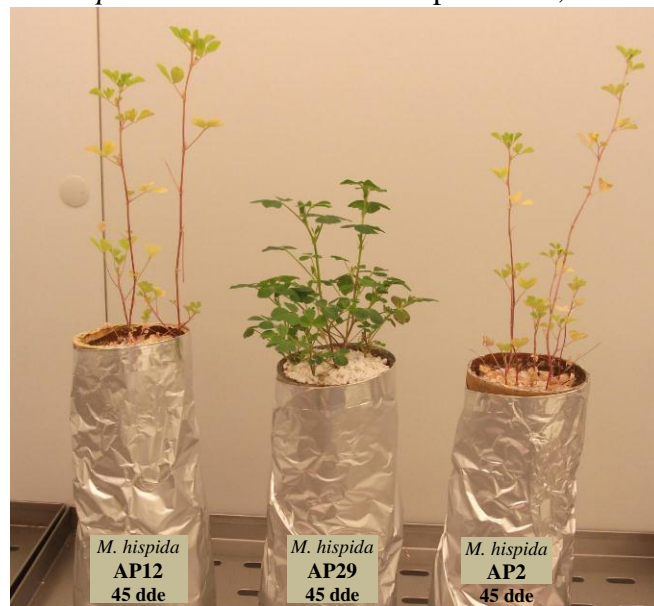
a. Triángulo inferior izquierda contiene el porcentaje de similitud del total de nucleótidos

b. Triángulo superior derecha contiene el número de observaciones diferentes/total nucleótidos

4.4. Caracterización simbiótica de las cepas aisladas de *M. hispida*

Para confirmar la capacidad de las cepas AP29 (*E. medicae*), AP12 (*R. giardini*) y AP2 (*K. granuli*) para nodular la planta hospedadora de la que se aislaron originalmente, se inocularon plantas de *M. hispida* con cada una de ellas. Sólo la cepa AP29 formó nódulos en el trébol andino, lo que confirma que se trata de un auténtico endosimbionte de *M. hispida* (Figura 4.9). No se observó la formación de nódulos cuando las tres cepas se emplearon para inocular plantas de *M. sativa* (Figura 4.9).

Figura 4.9. Plantas de *M. hispida* inoculadas con las cepas AP12, AP29 y AP2



En la Figura 4.10 se muestran plantas de *M. hispida* inoculadas con AP29 y los nódulos formados en sus raíces.

Figura 4.10. Plantas de *Medicago hispida* inoculadas con la cepa AP29



4.5. Biodiversidad microbiana en las chacras maiceras de Allpas

4.5.1. Procesamiento de las secuencias procedentes de la pirosecuenciación

El ADN de los suelos de las chacras maiceras se amplificó utilizando la región hipervariable V4 y V5 del gen 16S rRNA mediante los oligonucleótidos U519F y U926R y, posteriormente, los productos de amplificación se secuenciaron mediante el sistema 454 FLX Titanium. Las secuencias suministradas por Life Sequencing se procesaron utilizando el programa Ribosomal Database Project versión 10.29.

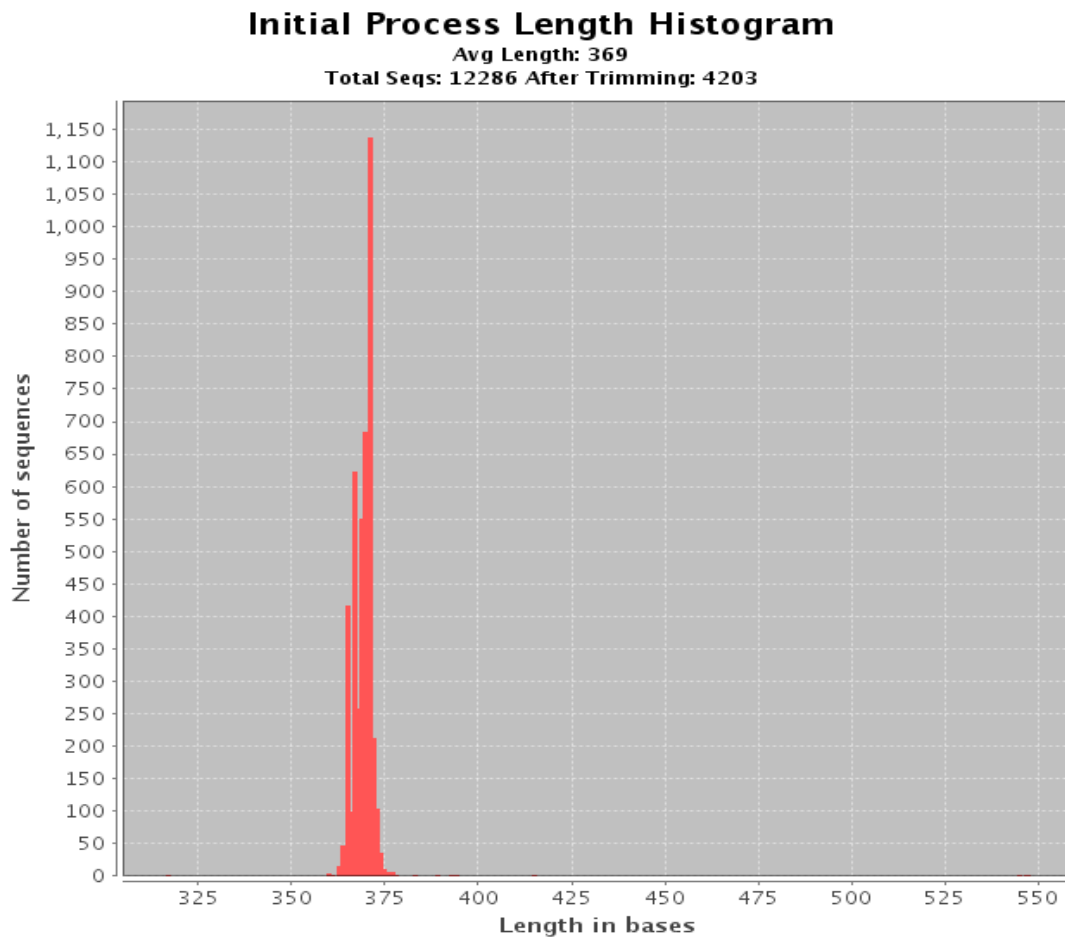
De la librería L-SR se obtuvieron 68.457 secuencias, de las que 21.364 (31.21%) corresponden a la muestra M-SR, tiene el mayor número de secuencias (21364) y el valor más bajo se determinó en el suelo MT-SR (12286), Para L-SNR se logró 71178 secuencias, el suelo MT-SNR posee el mayor numero de secuencias (18629) y el valor más bajo se logró en la muestra de suelo M-SNR (12284) (Tabla 4.10). Después de eliminar las secuencias de escasa calidad (aquellas que no se pueden leer y las de tamaño inferior a 200 pb) el número total se redujo en un 20,42% para la librería L-SR y en un 18,71% para la L-SNR. Finalmente, el número de secuencias se normalizó a 9.966, que fue el valor mínimo obtenido correspondiente a la muestra M-SNR (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Número de secuencias totales, calificadas y normalizadas obtenidas mediante pirosecuenciación 454 del ADN de las muestras de los suelos de las chacras maiceras.

Librería	Muestras de suelos	Número y tamaño medio de las secuencias			
		Totales	Cualificadas	Normalizadas	Tamaño (pb)
L-SR	MT-SR	12.286	10.064	9966	369
	T-SR	17.615	14.083	9966	369
	MF-SR	17.192	13.455	9966	369
	M-SR	21.364	16.871	9966	370
Total		68.457	54.473	Reducción: 20,42%	
L-SNR	MT-SNR	18.629	15.449	9966	369
	T-SNR	13.375	10.619	9966	369
	MF-SNR	12.947	10.479	9966	369
	M-SNR	12.284	9.966	9966	370
	D	13.943	11.341	9966	370
Total		71178	57854	Reducción en limpieza 18,71%	

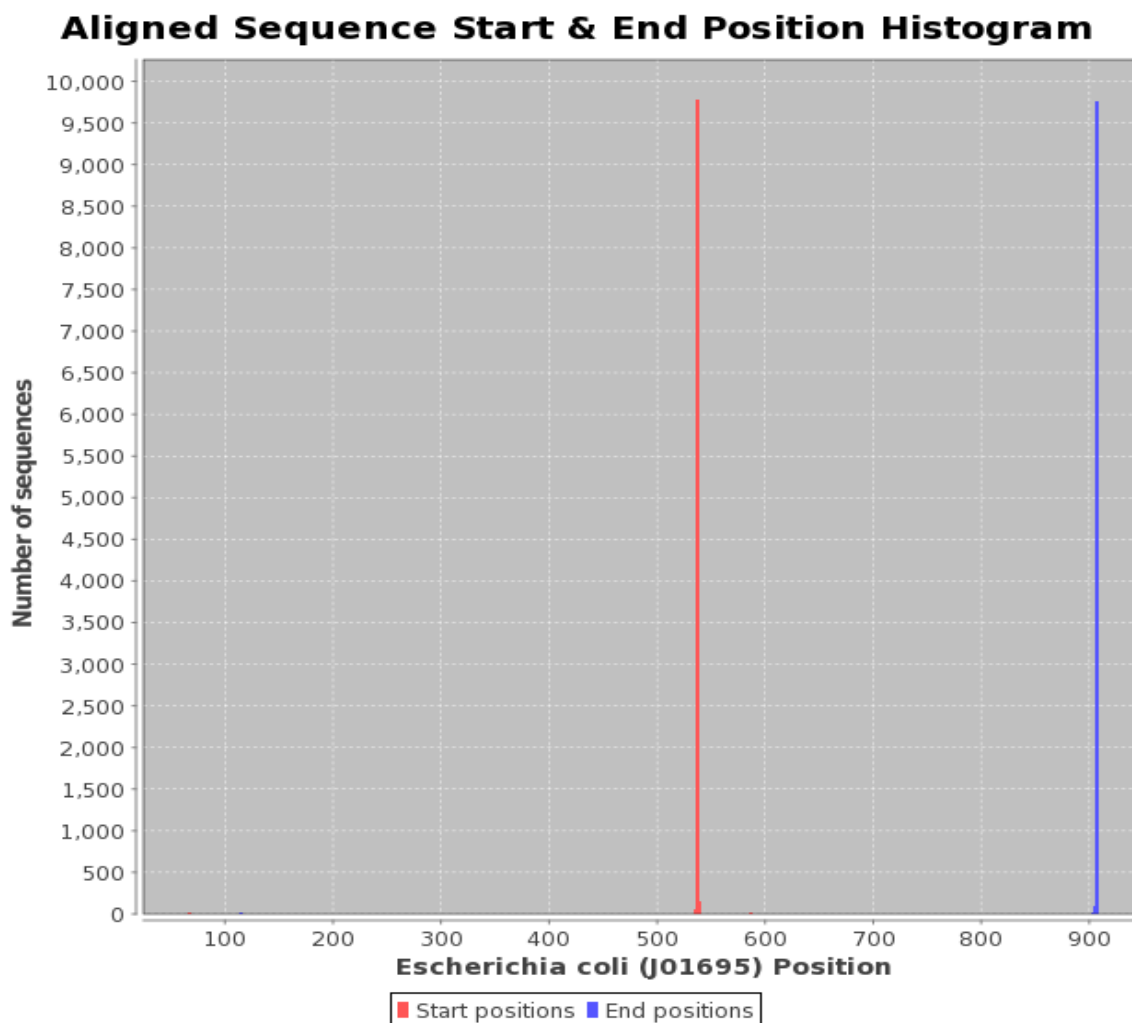
Para cada una de las 9 muestras, el tamaño medio de las secuencias varió de 369 a 370 pb. A modo de ejemplo, en la Figura 4.8 se muestra el histograma correspondiente a la muestra MT-SR (no se muestran los resultados correspondientes al resto de las muestras).

Figura 4.8. Tamaño medio de las secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación 454 de la muestra MT-SR



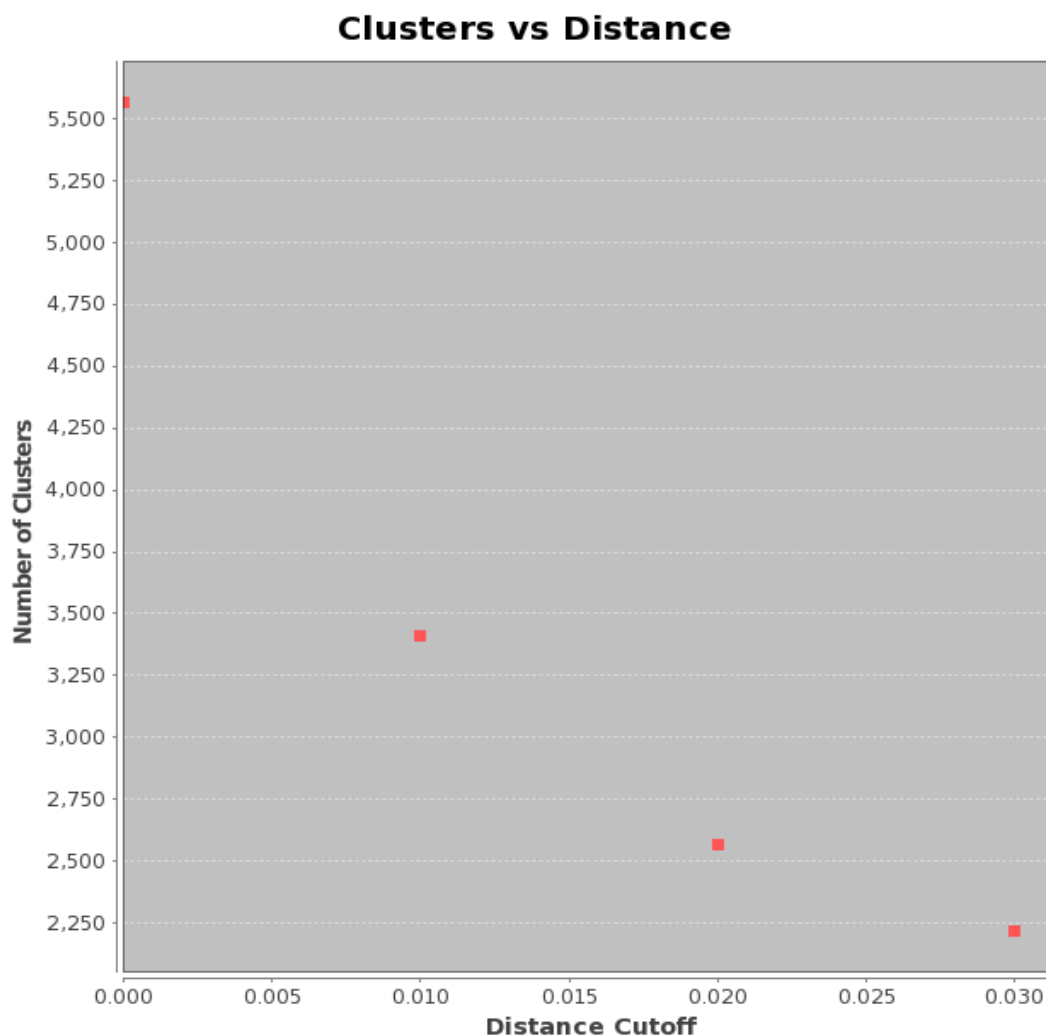
Para cada una de las 9 muestras, una vez normalizadas, el inicio y final de las secuencias coincidió, en la mayoría de los casos, con las posiciones de los nucleótidos 537 y 906 del gen 16S rRNA de *Escherichia coli* (J01695) que se utilizó como referencia. Para mantener la uniformidad con el caso anterior, en la Figura 4.9 se muestran los resultados obtenidos en la muestra MT-SR (no se muestra los resultados correspondientes al resto de las muestras). No se detectó ningún hueco (gap) en los alineamientos de las secuencias.

Figura 4.9. Posiciones inicial y final del alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas mediante pirosecuenciación. La secuencia del gen 16S rRNA de *E. coli* (J01695) se utilizó como referencia.



Una vez alineadas, las secuencias se agruparon mediante el comando “*Clustering*” de RDP para generar el número de OTUs. Como en los casos anteriores, en la Figura 4.10 se presenta el agrupamiento de las secuencias correspondientes a la muestra MT-S (no se muestran los resultados de las demás muestras).

Figura 4.10. Número de OTUs en la muestra MT-SR. Se representan los valores para porcentajes de similitud del 97%, 98%, 99% y 100%. El umbral de confianza fue superior al 80%.



El número de OTUs fue diferente entre las diferentes muestras, con valores que oscilaron de 1.963 para la muestra T-SNR a 2.515 para la muestra M-SR (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Número de OTUs determinados en muestras de las librerías L-SR y L-SNR

	L-SR				L-SNR				
	MT-SR	T-SR	MF-SR	M-SR	MT-SNR	T-SNR	MF-SNR	M-SNR	D
Número de OTUs	1.982	2.264	2.398	2.515	2.447	1.963	2.313	2.228	2.149

4.5.2. Clasificación y composición de la población microbiana

La clasificación de las secuencias se realizó empleando el comando “*Classifier*” de RDP, que permite su asignación a nivel de dominio (Tabla 4.12) y en las categorías taxonómicas de phyla, clase, orden, familia y género, los que se indican en la Tabla 4.13 y 4.14, respectivamente. Además del dominio Bacteria, la pirosecuenciación demostró la presencia de Archaea en las muestras analizadas (Tabla 4.12). El dominio Bacteria fue mayoritario ya que contribuyó con el 97.48%-99.77% de las secuencias (Tabla 4.12). El mayor porcentaje de Archaeas (2.42%) correspondió a las secuencias de las muestras de ADN procedentes del suelo D (Tabla 4.12).

Diez secuencias de la muestra D no fueron clasificadas a nivel de Dominio por el RDP.

Las secuencias de las librerías L-SR y L-SNR se agruparon en 28 phyla (Tabla 4.15), de las que Proteobacteria y Bacteroidetes fueron claramente mayoritarias ya que representaron entre el 12.16% y el 51.18% de todas las muestras, con la excepción de las muestras M-SR, M-SNR y D, en las que las secuencias de Acidobacteria superaron las de Bacteroidetes y Firmicutes. Las secuencias correspondientes a Archaea se agruparon en las phyla Crenarchaeota y Euryarchaeota con porcentajes que no superaron el 2.25% en la muestra D (Tabla 4.15). En esta misma muestra se obtuvo el mayor número (14.15%) de secuencias no clasificadas (Tabla 4.15). Una representación gráfica de los principales phyla identificados en las librerías L-SR y L-SNR se muestra en la figura 4.11, en la que no se incluyen los phyla que contienen menos de 105 secuencias.

Tabla 4.12. Número y porcentaje de las secuencias de las muestras de las librerías L-SR y LSNR que se incluyen en los dominios Bacteria y Archaea.

Dominio	L-SR				L-SNR				
	MT-SR	T-SR	MF-SR	M-SR	MT-SNR	T-SNR	MF-SNR	M-SNR	D-SNR
Bacteria	9.938 (99,72%)*	9.932 (99,66%)	9.912 (99,46%)	9.918 (99,52%)*	9.894 (99,28%)	9.943 (99,77%)	9.921 (99,55%)	9.808 (98,41%)	9.715 (97,48%)
Archaea	28 (0,28%)	24 (0,24%)	52 (0,52%)	41 (0,41%)	68 (0,68%)*	22 (0,22%)	45 (0,45%)	155 (1,56%)*	241 (2,42%)
Sin clasificar	0 (0%)	10 (0,1%)	2 (0,02%)	7 (0,07%)	4 (0,04%)	1 (0,01%)	0 (0%)	3 (0,03%)	10 (0,1%)
Total	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)

* = significantivamente diferente a 0,01

Tabla 4.13. Clasificación de las secuencias de la librería L-SR. Se indica la categoría taxonómica, el número de taxa (N), el número de secuencias (S) y el porcentaje de las mismas

Taxon	L-SR							
	MT-SR		T-SR		MF-SR		M-SR	
	N	S	N	S	N	S	N	S
Phylum	19	9.308 (93,4%)	21	9.195 (92,26%)	24	9.082 (91,13%)	23	8.665 (86,95%)
Clase	38	8.573 (86,02%)	45	8.650 (86,8%)	46	7.798 (78,25%)	43	7.864 (78,91%)
Orden	40	6.972 (69,96%)	45	6.782 (68,05%)	56	6.226 (62,47%)	47	4.738 (47,54%)
Familia	88	6.442 (64,64%)	101	5.861 (58,81%)	111	5.773 (57,93%)	105	3.896 (39,09%)
Género	199	5.580 (55,99%)	221	5.000 (50,17%)	212	4.423 (44,39%)	209	5.374 (53,91%)
Secuencias no clasificadas		658 (6,6%)		771 (7,74%)		884 (8,87%)		1.301 (13,05%)
OTUs	1.982	9.966 (100%)	2.264	9.966 (100%)	2.398	9.966 (100%)	2.515	9.966 (100%)

Tabla 4.14. Clasificación de las secuencias de la librería L-SNR. Se indica la categoría taxonómica, el número de taxa (N), el número de secuencias (S) y el porcentaje de las mismas.

Taxon	L-SNR									
	MT-SNR		T-SNR		MF-SNR		M-SNR		D	
	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
Phylum	21	8.919 (89,49%)	19	9.221 (92,52%)	23	8.771 (88,01%)	21	8.764 (87,94%)	20	8.555 (85,84%)
Clase	42	7.905 (79,32%)	36	8.574 (86,03%)	41	7.556 (75,82%)	43	8.149 (81,77%)	38	8.075 (81,03%)
Orden	45	5.246 (52,64%)	39	6.839 (68,62%)	42	5.808 (58,28%)	43	4.363 (43,78%)	37	3.744 (37,57%)
Familia	97	4.553 (45,69%)	88	6.230 (62,51%)	98	5.272 (52,9%)	87	3.189 (32,00%)	86	2.901 (29,11%)
Género	196	4.975 (49,92%)	181	4.574 (45,9%)	212	4.587 (46,06%)	183	5.028 (50,46%)	179	4.782 (47,98%)
Secuencias no clasificadas		1.047 (10,51%)		745 (7,48%)		1.195 (11,99%)		1.202 (12,06%)		1.411 (14,16%)
OTUs	2.447	9.966	1.963	9.966 (100%)	2.313	9.966 (100%)	2.228	9.966 (100%)	2149	9.966 (100%)

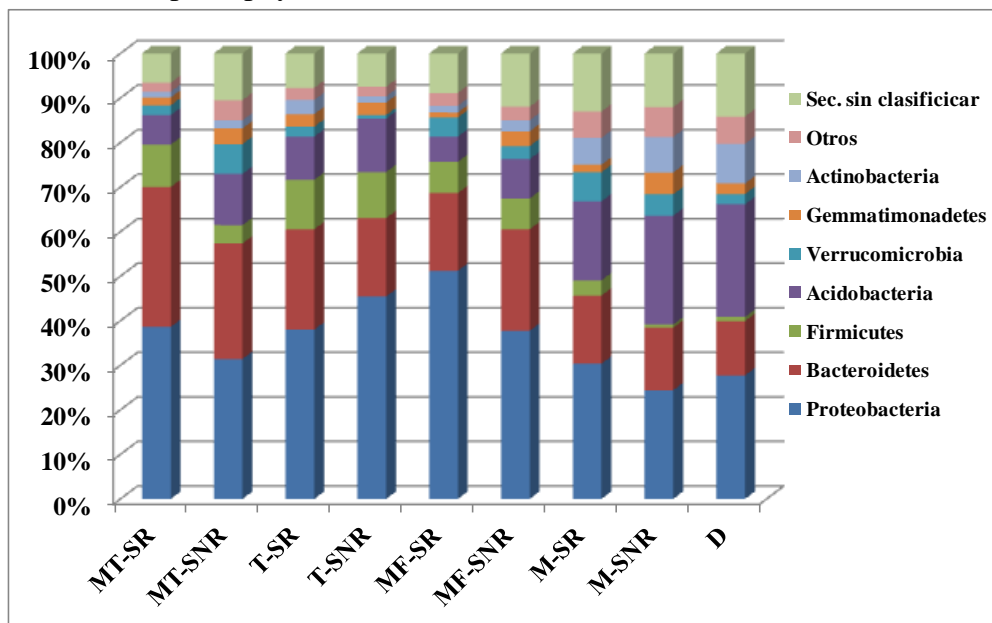
Tabla 4.15. Distribución en phyla de las secuencias de las librerías L-SR y L-SNR

Phyla	Número de secuencias								
	L-SR				L-SNR				
	MT-SR	T-SR	MF-SR	M-SR	MT-SNR	T-SNR	MF-SNR	M-SNR	D
Proteobacteria	3.847* (38,6%)	3.788 (38,01%)	5.101* (51,18%)	3.024* (30,34%)	3.127 (31,38%)	4.526* (45,41%)	3.760 (37,73%)	2.428 (24,36%)	2.763 (27,72%)
Bacteroidetes	3.130* (31,41%)	2.247* (22,55%)	1.737 (17,43%)	1.525 (15,3%)	2.586 (25,95%)	1.751 (17,57%)	2.271* (22,79%)	1.398 (14,03%)	1.212 (12,16%)
Firmicutes	943* (9,46%)	1.107 (11,11%)	701 (7,03%)	342* (3,43%)	405 (4,06%)	1.030 (10,34%)	689 (6,91%)	69 (0,69%)	92 (0,92%)
Acidobacteria	661 (6,63%)	965 (9,68%)	563 (5,65%)	1.766 (17,72%)	1.143* (11,47%)	1.194* (11,98%)	878* (8,81%)	1.435* (24,43%)	2.517 (25,26%)
Verrucomicrobia	215 (2,16%)	223* (2,24%)	425* (4,26%)	650* (6,52%)	664* (6,66%)	80 (0,8%)	294 (2,95%)	476 (4,78%)	234 (2,35%)
Actinobacteria	133 (1,33%)	317* (3,18%)	154 (1,55%)	600 (6,02%)	177 (1,78%)	138 (1,38%)	247* (2,48%)	797* (8%)	883 (8,86%)
emmatimonadetes	174 (1,75%)	279 (2,8%)	113 (1,13%)	168 (1,69%)	350* (3,51%)	277 (2,78%)	325* (3,26%)	485* (4,87%)	233 (2,34%)
Planctomycetes	48 (0,48%)	63* (0,63%)	57 (0,57%)	90 (0,9%)	50 (0,5%)	37 (0,37%)	43 (0,43%)	69 (0,69%)	105 (1,05%)
Chloroflexi	25 (0,25%)	19 (0,19%)	46 (0,46%)	179 (1,8%)	49* (0,49%)	23 (0,23%)	69 (0,69%)	216 (2,17%)	131 (1,31%)
Nitrospira	40 (0,4%)	35 (0,35%)	39 (0,39%)	23 (0,23%)	75* (0,75%)	51 (0,51%)	46 (0,46%)	51* (0,51%)	79 (0,79%)
Crenarchaeota	28 (0,28%)	24 (0,24%)	35 (0,35%)	40 (0,4%)	67 (0,67%)	20 (0,2%)	41 (0,41%)	149 (1,5%)	224 (2,25%)
Armatimonadetes	25 (0,25%)	42 (0,42%)	34 (0,34%)	53 (0,53%)	47* (0,47%)	52 (0,52%)	56 (0,56%)	113* (1,13%)	37 (0,37%)
OD1	22 (0,22%)	38* (0,38%)	22 (0,22%)	85* (0,85%)	92* (0,92%)	14 (0,14%)	22 (0,22%)	24 (0,24%)	1 (0,01%)
Chlamydiae	1 (0,01%)	7* (0,07%)	9* (0,09%)	24* (0,24%)	25* (0,25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Euryarchaeota	0 (0%)	0 (0%)	9 (0,09%)	1 (0%)	0 (0%)	2 (0,02%)	1 (0,01%)	6 (0,06%)	16 (0,16%)
Spirochaetes	4 (0,04%)	1 (0,01%)	8 (0,08%)	9 (0,09%)	8 (0,08%)	0 (0%)	2 (0,02%)	9 (0,09%)	0 (0%)
BRC1	4 (0,04%)	7 (0,07%)	6 (0,06%)	3 (0,03%)	6 (0,06%)	8 (0,08%)	6 (0,06%)	5 (0,05%)	2 (0,02%)
TM7	5 (0,05%)	21* (0,21%)	6 (0,06%)	61* (0,61%)	32* (0,32%)	7 (0,07%)	1 (0,01%)	10 (0,1%)	10 (0,1%)
Chlorobi	0 (0%)	1 (0,01%)	4 (0,04%)	5 (0,05%)	3 (0,03%)	5 (0,05%)	2 (0,02%)	3 (0,03%)	1 (0,01%)
Elusimicrobia	0 (0%)	0 (0%)	4 (0,04%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,02%)	0 (0%)	0 (0%)

Fibrobacteres	0 (0%)	0 (0%)	3 (0,03%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Lentisphaerae	0 (0%)	0 (0%)	3 (0,03%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tenericutes	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,02%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
WS3	2 (0,02%)	1 (0,01%)	1 (0,01%)	4 (0,04%)	5 (0,05%)	4 (0,04%)	2 (0,02%)	10 (0,1%)	8 (0,08%)
Cyanob./Chloroplast	0 (0%)	7 (0,07%)	0 (0%)	3 (0,03%)	2 (0,02%)	2 (0,02%)	8* (0,08%)	5 (0,05%)	2 (0,02%)
Deinococcus- Thermus	0 (0%)	3 (0,03%)	0 (0%)	5 (0,05%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Fusobacteria	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0,00%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,01%)	0 (0%)	0 (0%)
OP11	1 (0,01%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (0,05%)	6 (0,06%)	0 (0%)	5 (0,05%)	6 (0,06%)	5 (0,05%)
Secuencias no clasificadas	658 (6,6%)	771 (7,74%)	884 (8,87%)	1.301 (13,05%)	1.047 (10,51%)	745 (7,48%)	1.195 (11,99%)	1.202 (12,06%)	1.411 (14,16%)
Total	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)	9.966 (100%)

*significativamente diferente a valores de $P = 0,01$

Figura 4.11 Principales phyla identificados en suelos de las chacras maiceras de Allpas



Las 28 phyla de la dos librerías agruparon en 46 clases, 56 órdenes, 111 familias y 403 géneros (Tabla 4.16).

Tabla 4.16. Géneros identificados, y su número de secuencias, en las librerías L-SR y L-SNR.

Nº	Géneros	Número de secuencias								
		L-SR				L-SNR				
		MT-SR	T-SR	MF-SR	M-SR	MT-SNR	T-SNR	MF-SNR	M-SNR	D
1	<i>Flavobacterium</i>	1.184	485	212	158	548	605	403	37	73
2	<i>Dechloromonas</i>	1.161	37	1.024	7	75	340	620	1	1
3	<i>Ohtaekwangia</i>	248	53	90	255	222	39	117	129	256
4	<i>Acidovorax</i>	246	63	13	6	21	115	43	3	14
5	<i>Bacillus</i>	209	56	15	80	12	64	131	19	17
6	<i>Arenimonas</i>	193	180	30	15	107	107	34	43	25
7	<i>Gp4</i>	191	325	147	1.125	396	408	305	1.434	850
8	<i>Gp6</i>	181	157	127	349	317	240	159	622	1.224
9	<i>Gemmatimonas</i>	174	279	113	168	350	277	325	485	233
10	<i>Clostridium III</i>	107	32	131	8	44	105	82	0	0
11	<i>Gp1</i>	103	164	141	71	101	136	138	33	7
12	<i>Opitutus</i>	89	112	132	98	149	53	211	139	118
13	<i>Subdivision3_genera _incertae_sedis</i>	86	69	232	349	372	13	52	237	52
14	<i>Ferruginebacter</i>	78	53	6	22	50	49	20	25	20
15	<i>Legionella</i>	53	10	2	1	49	4	5	5	4
16	<i>Massilia</i>	52	41	42	2	45	68	136	17	8
17	<i>Fluviicola</i>	43	4	16	5	87	6	91	2	1
18	<i>Nitrospira</i>	40	35	39	23	75	51	46	51	79
19	<i>Gp3</i>	38	68	38	63	85	60	48	99	59
20	<i>Geobacter</i>	37	13	342	27	87	65	136	3	0
21	<i>Terrimonas</i>	34	26	6	34	35	28	13	63	70

22	<i>Gracilibacter</i>	33	13	83	18	72	94	81	0	0
23	<i>Gp5</i>	32	7	23	35	41	39	33	67	62
24	<i>Gp7</i>	32	44	16	49	72	54	59	100	217
25	<i>Pseudomonas</i>	30	13	26	35	46	6	4	3	2
26	<i>Albidiferax</i>	30	17	125	3	18	67	4	0	0
27	<i>Duganella</i>	29	17	17	20	35	40	17	18	3
28	<i>Phenylobacterium</i>	28	99	22	26	33	43	30	63	31
29	<i>Sphingomonas</i>	26	78	23	46	59	7	9	55	60
30	<i>Anaerovorax</i>	24	9	9	5	4	20	24	0	0
31	<i>OD1_genera _incertae_sedis</i>	22	38	22	85	92	14	22	24	1
32	<i>Variovorax</i>	20	45	12	19	14	9	91	16	15
33	<i>Methylophilus</i>	20	34	67	8	33	13	12	7	0
34	<i>Adhaeribacter</i>	19	9	4	2	25	10	6	13	37
35	<i>Clostridium sensu stricto</i>	19	190	0	0	0	34	12	1	1
36	<i>Steroidobacter</i>	19	34	12	30	57	20	16	54	122
37	<i>Pedobacter</i>	17	197	5	33	22	6	23	2	23
38	<i>Sediminibacterium</i>	17	15	5	8	6	3	2	10	0
39	<i>Bradyrhizobium</i>	16	49	25	40	15	43	25	32	22
40	<i>Flavisolibacter</i>	16	22	4	22	26	18	10	44	13
41	<i>Magnetospirillum</i>	16	1	34	2	126	128	39	0	0
42	<i>Spartobacteria _genera_incertae_sedis</i>	15	22	17	153	64	6	7	87	19
43	<i>Chitinophaga</i>	14	6	0	5	12	3	19	13	27
44	<i>Mucilagibacter</i>	14	169	18	72	30	18	42	27	2
45	<i>Roseateles</i>	14	8	7	9	3	1	1	9	15
46	<i>Sphingobium</i>	14	6	0	4	2	6	0	5	0
47	<i>Chotonomonas/ Armatimonadetes_gp3</i>	13	25	14	19	24	25	27	57	8
48	<i>Dongia</i>	13	9	11	17	5	14	10	7	17
49	<i>Aquicella</i>	12	3	10	8	20	7	8	4	2
50	<i>Novosphingobium</i>	12	107	5	16	5	17	3		16
51	<i>Oxacilibacterium</i>	12	19	54	5	166	161	51	5	3
52	<i>Planctomyces</i>	12	9	18	10	21	7	10	9	22
53	<i>Cytophaga</i>	10	10	5	3	7	1	7	0	2
54	<i>Devosia</i>	10	41	7	11	5	15	6	14	21
55	<i>Haliangium</i>	10	27	14	43	31	23	30	103	67
56	<i>Nocardoides</i>	10	16	12	10	17	8	15	30	44
57	<i>Pelosinus</i>	10	52	10	5	2	71	34		1
58	<i>Asticcacaulis</i>	9	9	1	5	4	4	3	1	4
59	<i>Fervidicella</i>	9	7	7	1	10	35	5	0	0
60	<i>Polaromonas</i>	9	42	40	3	8	3	14	2	4
61	<i>Solirubrobacter</i>	9	7	5	16	16	7	15	36	45
62	<i>Desulfosporosinus</i>	8	6	4	5	8	9	1	0	0
63	<i>Flavitalea</i>	8	18	4	5	22	14	15	10	11
64	<i>Janthinobacterium</i>	8	26	1	12	2	11	0	0	0
65	<i>Bacteriovorax</i>	7	11	8	3	4	3	13	3	0
66	<i>Falsibacillus</i>	7	1	0	0	0	5	0	0	0
67	<i>Gp22</i>	7	1	3	1	12	1	1	1	3
68	<i>Pasteuria</i>	7	8	7	37	8	9	11	17	49
69	<i>Rhizomicrobium</i>	7	93	6	1	7	26	11	2	1

70	<i>Zavarzinella</i>	7	8	3	19	2	1	3	5	8
71	<i>Armatimonadetes_gp4</i>	6	10	7	0	9	21	0	42	28
72	<i>Clostridium XIVa</i>	6	23	6	1	1	4	5	0	0
73	<i>Rhodanobacter</i>	6	72	1	0	6	5	7	0	0
74	<i>Undibacterium</i>	6	4	7	15	7	45	44	1	1
75	<i>Azospirillum</i>	5	0	3	3	7	13	3	0	0
76	<i>Bdellovibrio</i>	5	7	6	13	15	1	1	7	0
77	<i>Cystobacter</i>	5	1	5	0	3	4	2	3	1
78	<i>Gp10</i>	5	6	11	23	14	12	16	31	21
79	<i>Lysobacter</i>	5	5		8	10	2	6	42	47
80	<i>Mesorhizobium</i>	5	7	2	3	4	2	3	5	10
81	<i>Nitrosospira</i>	5	7	0	1	2	0	1	1	3
82	<i>Schlesneria</i>	5	3	3	4	1	2	0	4	5
	<i>TM7_genera</i>									
83	<i>_incertae_sedis</i>	5	21	6	61	32	7	1	10	10
84	<i>Hydrogenophaga</i>	4	2	14	36	0	2	30	0	0
85	<i>Rhizobium</i>	4	18	4	66	3	2	4	2	13
	<i>BRC1_genera</i>									
86	<i>_incertae_sedis</i>	4	7	6	3	6	8	6	5	2
87	<i>Sporomusa</i>	4	1	4	1	0	4	4	0	0
88	<i>Methylobacterium</i>	3	4	0	0	0	3	3	1	3
89	<i>Pelomonas</i>	3	5	5	8	5	0	3	2	1
90	<i>Stenotrophomonas</i>	3	16	0	0	2	3	0	6	1
91	<i>Altererythrobacter</i>	3	0	0	1	3	0	1	2	5
92	<i>Armatimonadetes_gp1</i>	3	7	5	6	5	1	6	8	1
93	<i>Aureispira</i>	3	0	0	0	3	0	5	0	0
94	<i>Caldilinea</i>	3	1	0	4	0	0	0	4	6
95	<i>Enhygromyxa</i>	3	2	4	2	7	0	2	2	5
96	<i>Erythrobacter</i>	3	0	0	0	4	0	0	0	4
97	<i>Geodermatophilus</i>	3	2	1	0	0	0	1	3	2
98	<i>Hyphomicrobium</i>	3	0	1	0	3	3	1	1	4
99	<i>Kribbella</i>	3	1	1	4	1	0	0	10	11
100	<i>Lacibacter</i>	3	2	1	1	2	2	3	0	10
101	<i>Naxibacter</i>	3	4	1	0	1	3	0	7	2
102	<i>Oxobacter</i>	3	2	4	0	2	7	9	0	0
103	<i>Pedomicrobium</i>	3	0	0	1	4	2	4	2	12
104	<i>Pseudolabrys</i>	3	13	0	7	6	2	7	9	1
105	<i>Ramlibacter</i>	3	5	1	1	0	2	1	0	0
106	<i>Rhizobacter</i>	3	6	3	1	3	4	2	5	2
107	<i>Segetibacter</i>	3	29	7	17	6	12	19	39	5
108	<i>Shinella</i>	3	0	4	0	1	2	2	1	3
109	<i>Arthrobacter</i>	2	15	6	6	2	8	10	6	9
110	<i>Cellulomonas</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
111	<i>Delftia</i>	2	0	0	6	0	2	0	0	0
112	<i>Herbaspirillum</i>	2	9	2	0	0	7	2	0	0
113	<i>Streptomyces</i>	2	5	2	21	2	2	5	36	54
114	<i>Aciditerrimonas</i>	2	1	0	6	0	1	2	0	0
115	<i>Agromyces</i>	2	11	0	1	0	1	0	1	20
116	<i>Armatimonadetes_gp2</i>	2	0	6	0	4	5	0	0	0
117	<i>Byssovorax</i>	2	2	1	2	4	5	3	3	2
118	<i>Caulobacter</i>	2	11	2	0	2	9	0	2	13

119	<i>Cellvibrio</i>	2	2	5	2	2	0	1	0	0
120	<i>Cohnella</i>	2	4	0	0	0	0	0	0	0
121	<i>Desulfitobacterium</i>	2	7	1	0	0	1	0	0	0
122	<i>Fervidicoccus</i>	2	4	2	1	8	2	2	3	1
123	<i>Georgfuchsia</i>	2	1	7	0	5	7	3	1	0
124	<i>Gp17</i>	2	0	0	10	8	4	3	15	29
125	<i>Herminiimonas</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
126	<i>Labrys</i>	2	5		1	0	1		1	1
127	<i>Longilinea</i>	2	0	2	0	0	1	0	0	0
128	<i>Luteolibacter</i>	2	2	1	1	4	0	0	1	0
129	<i>Marmoricola</i>	2	8	6	11	7	2	5	14	13
130	<i>Microlunatus</i>	2	1	1	7	2	0	1	4	2
131	<i>Modestobacter</i>	2	2	0	0	0	1	1	0	1
132	<i>Niastella</i>	2	3	0	2	4	2	1	2	11
133	<i>Prostheco bacter</i>	2	0	0	0	8	0	0	0	0
134	<i>Pseudonocardia</i>	2	26	3	10	3	1	4	19	15
135	<i>Sedimentibacter</i>	2	22	5	0	0	4	4	0	0
136	<i>Skermanella</i>	2	7	6	4	2	3	6	6	9
137	<i>Solitalea</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
138	<i>Sporobacter</i>	2	0	5	2	1	5	7	0	0
139	<i>Uliginosibacterium</i>	2	1	0	1	8	0	0	2	0
	<i>WS3_genera</i>									
140	<i>_incertae_sedis</i>	2	1	1	4	5	4	2	10	8
141	<i>Azonexus</i>	1	0	49	1	2	51	20	0	1
142	<i>Burkholderia</i>	1	7	2	1	3	2	2	1	2
143	<i>Microbacterium</i>	1	5	2	7	1	0	1	0	5
144	<i>Rhodobacter</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0
145	<i>Aeromicrobium</i>	1	31	2	8	0	2	1	14	20
146	<i>Ajfifella</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
147	<i>Afipia</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0
148	<i>Agrococcus</i>	1	2	0	0	0	0	1	0	0
149	<i>Amaricoccus</i>	1	0	4	0	1	0	0	0	0
150	<i>Anaerococcus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0
151	<i>Anaeromyxobacter</i>	1	11	24	25	8	14	17	8	7
152	<i>Armatimonadetes_gp5</i>	1	0	2	0	5	0	0	6	0
153	<i>Bauldia</i>	1	2	0	1	3	2	1	5	1
154	<i>Bellilinea</i>	1	1	0	3	1	1	2	0	0
155	<i>Blastococcus</i>	1	8	2	3	5	1	10	9	10
156	<i>Brevundimonas</i>	1	35	1	0	1	2	0	0	6
157	<i>Buttiauxella</i>	1	9	0	4	0	2	0	0	0
158	<i>Chryseobacterium</i>	1	14	0	51	2	1	0	0	1
159	<i>Conexibacter</i>	1	1	2	3	0	1	6	3	2
160	<i>Corallococcus</i>	1	0	1	3	0	1	0	0	1
161	<i>Crocinitomix</i>	1	0	0	0	0	0	3	0	0
162	<i>Desulfuromonas</i>	1	0	17	0	4	0	5	0	0
163	<i>Dokdonella</i>	1	3	0	0	1	1	1	1	0
164	<i>Edaphobacter</i>	1	3	0	0	1	0	0	0	0
165	<i>Ethanoligenens</i>	1	0	2	0	0	1	0	0	0
166	<i>Exiguobacterium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
167	<i>Gemmata</i>	1	6	4	6	0	1	3	5	8
168	<i>Gp11</i>	1	0	0	1	3	1	0	2	8

169	<i>Gp25</i>	1	1	2	7	3	3	4	10	7
170	<i>Herpetosiphon</i>	1	0	0	2	1	0	0	2	6
171	<i>Kaistia</i>	1	8	0	0	1	1	0	0	0
172	<i>Kineosporia</i>	1	1	1	2	0	0	2	4	2
173	<i>Leifsonia</i>	1	2	1	2	2	0	1	1	1
174	<i>Leptonema</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0
175	<i>Luteimonas</i>	1	5	0	0	1	2	2	0	0
176	<i>Lutispora</i>	1	0	5	0	1	0	0	0	0
177	<i>Mycobacterium</i>	1	3	2	4	5	2	3	10	7
178	<i>Myxococcus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
179	<i>Oceanibaculum</i>	1	0	0	1	0	1	1	1	0
180	<i>OP11_genera _incertae_sedis</i>	1	0	0	5	6	0	5	6	5
181	<i>Paenibacillus</i>	1	86	2	1	0	0	2	2	2
182	<i>Parasporobacterium</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0
183	<i>Porphyrobacter</i>	1	5	1	1	2	2	2	0	1
184	<i>Propionivibrio</i>	1	0	30	0	8	7	13	0	0
185	<i>Rhodococcus</i>	1	5	2	0	1	2	10	3	0
186	<i>Rhodoferax</i>	1	0	6	767	0	0	2	0	0
187	<i>Sanguibacter</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
188	<i>Sphaerobacter</i>	1	3	0	2	2	2	1	3	7
189	<i>Spirochaeta</i>	1	0	0	2	1	0	1	4	0
190	<i>Spirosoma</i>	1	6	0	1	0	0	0	1	0
191	<i>Telmatospirillum</i>	1	0	0	0	0	4	0	0	0
192	<i>Terrabacter</i>	1	4	0	2	0	0	1	1	1
193	<i>Terriglobus</i>	1	5	0	1	0	0	0	0	0
194	<i>Thermincola</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
195	<i>Turcibacter</i>	1	1	0	0	2	0	0	1	0
196	<i>Turneriella</i>	1	1	2	0	7	0	0	0	0
197	<i>Vasilyevaea</i>	1	2	1	1	1	0	0	0	4
198	<i>Vogesella</i>	1	0	3	0	0	1	6	0	0
199	<i>Williamsia</i>	1	0	0	0	0	0	2	0	0
200	<i>Acidobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
201	<i>Azoarcus</i>	0	0	49	0	0	2	5	0	0
202	<i>Azohydromonas</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
203	<i>Brevibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	1
204	<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
205	<i>Curtobacterium</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0
206	<i>Ensifer</i>	0	18	0	0	0	0	0	1	1
207	<i>Ideonella</i>	0	0	1	0	0	0	1	7	0
208	<i>Microbispora</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0
209	<i>Pantoea</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	2
210	<i>Phyllobacterium</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
211	<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	1	0	0	3	0	2
212	<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
213	<i>Acediterrimonas</i>	0	0	0	0	3	0	0	3	0
214	<i>Acetivibrio</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
215	<i>Acholeplasma</i>	0	0	2	2	0	0	0	0	0
216	<i>Acidiphilium</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
217	<i>Acidisoma</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
218	<i>Acidocella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1

219	<i>Acidothermus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
220	<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
221	<i>Actinoallomurus</i>	0	0	0	3	0	0	1	2	0
222	<i>Actinocorallia</i>	0	0	0	1	1	0	0	1	0
223	<i>Actinomadura</i>	0	0	0	5	0	0	0	2	1
224	<i>Actinophycotola</i>	0	0	0	4	0	0	0	4	4
225	<i>Actinoplanes</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	1
226	<i>Aeromonas</i>	0	1	3	0	5	3	0	0	0
227	<i>Algoriphagus</i>	0	0	3	1	0	0	1	0	0
228	<i>Alkanindiges</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
229	<i>Alterococcus</i>	0	0	2	0	0	1	1	3	0
230	<i>Aminobacter</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
231	<i>Amnibacterium</i>	0	4	0	0	0	1	0	0	0
232	<i>Amycolatopsis</i>	0	0	0	7	0	0	0	3	0
233	<i>Anaerobacter</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
234	<i>Anaerorhabdus</i>	0	0	31	0	0	0	1	0	0
235	<i>Anaerotruncus</i>	0	0	2	0	0	0	1	0	0
236	<i>Ancylobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
237	<i>Aquabacterium</i>	0	3	1	5	1	2	3	6	0
238	<i>Arcicella</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0
239	<i>Arcobacter</i>	0	0	21	0	0	0	0	0	0
240	<i>Arenibacter</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
241	<i>Armatimodetes_gp2</i>	0	0	0	0	0	0	8	0	0
242	<i>Armatimodetes_gp4</i>	0	0	0	0	0	0	14	0	0
243	<i>Armatimodetes_gp4</i>	0	0	0	22	0	0	0	0	0
244	<i>Armatimodetes_gp5</i>	0	0	0	6	0	0	1	0	0
245	<i>Aspromonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
246	<i>Aurantimonas</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
247	<i>Azospira</i>	0	0	9	0	0	0	1	0	0
248	<i>Bacillariophyta</i>	0	2	0	0	2	0	2	3	1
249	<i>Bacteroides</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0
250	<i>Beggiatoa</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
251	<i>Beijerinckia</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	1
252	<i>Blastobacter</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
253	<i>Blastopirellula</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	5
254	<i>Bordetella</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0
255	<i>Bryobacter</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0
256	<i>Caryophanon</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0
257	<i>Catenulispora</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
258	<i>Chelatococcus</i>	0	1	0	0	0	0	1	2	2
259	<i>Chitinibacter</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
260	<i>Chitinimonas</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0
261	<i>Chlorophyta</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
262	<i>Chondromyces</i>	0	0	0	1	0	0	0	3	0
263	<i>Clostridium sensu stricto</i>	0	0	14	18	10	0	0	0	0
264	<i>Clostridium IV</i>	0	21	4	0	0	0	8	0	0
265	<i>Clostridium XI</i>	0	2	2	0	1	1	0	1	0
266	<i>Collimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
267	<i>Coxiella</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	1
268	<i>Craurococcus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1

269	<i>Cryptosporangium</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	2
270	<i>Cupriavidus</i>	0	1	0	1	0	0	0	1	1
271	<i>Curvibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
272	<i>Dactylosporangium</i>	0	0	0	4	0	0	0	1	1
273	<i>Dehalobacter</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0
274	<i>Demequina</i>	0	0	1	0	2	0	0	0	0
275	<i>Desulfobulbus</i>	0	0	15	0	0	0	6	0	0
276	<i>Desulfovibrio</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
277	<i>Dyadobacter</i>	0	35	0	4	1	3	0	2	4
278	<i>Dyella</i>	0	28	0	0	1	0	0	0	0
279	<i>Elusimicrobium</i>	0	0	4	0	0	0	2	0	0
280	<i>Emticicia</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	4
281	<i>Epilithonimonas</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0
282	<i>Erythromicrobium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
283	<i>Ferribacterium</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	0
284	<i>Fibrella</i>	0	0	3	0	0	0	1	0	0
285	<i>Formivibrio</i>	0	0	1	0	0	4	0	0	0
286	<i>Friedmanniella</i>	0	1	1	0	0	1	1	0	0
287	<i>Fusibacter</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0
288	<i>Geothrix</i>	0	47	2	0	0	0	7	0	0
289	<i>Gp13</i>	0	0	1	0	3	0	0	0	0
290	<i>Gp15</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
291	<i>Gp16</i>	0	2	1	2	0	0	0	1	0
292	<i>Gp18</i>	0	0	0	0	0	0	0	5	19
293	<i>Gp2</i>	0	4	1	0	5	7	2	0	0
294	<i>GpI</i>	0	1	0	2	0	0	1	0	0
295	<i>Granulicella</i>	0	26	0	0	1	4	1	0	0
296	<i>Hidrotalea</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
297	<i>Holophaga</i>	0	0	2	0	1	126	1	0	0
298	<i>Humicoccus</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0
299	<i>Hyalangium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
300	<i>Hymenobacter</i>	0	8	0	0	3	3	1	13	1
301	<i>Iama</i>	0	0	0	1	2	1	0	1	0
302	<i>Ignabacterium</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0
303	<i>Ignavibacterium</i>	0	1	4	5	2	5	0	3	1
304	<i>Ilumatobacter</i>	0	0	0	1	1	0	0	2	0
305	<i>Inhella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
306	<i>Inquilinus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
307	<i>Jiangella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	8
308	<i>Kitasatospora</i>	0	1	0	0	0	0	1	2	0
309	<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
310	<i>Ktedonobacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
311	<i>Lactobacillus</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0
312	<i>Lactococcus</i>	0	14	0	0	0	0	0	0	0
313	<i>Larkinella</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
314	<i>Lechevalieria</i>	0	0	0	1	1	0	0	3	0
315	<i>Lentzea</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	11
316	<i>Leptolinea</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
317	<i>Leptospira</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
318	<i>Lewinella</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1
319	<i>Luedemannella</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0

320	<i>Luteibacter</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
321	<i>Lysinibacillus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	2
322	<i>Meiothermus</i>	0	3	0	5	0	0	0	0	0
323	<i>Methanocorpusculum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
324	<i>Methylobacter</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	0
325	<i>Methylovorus</i>	0	0	0	2	0	0	0	1	0
326	<i>Micromonospora</i>	0	0	0	2	0	0	0	10	1
327	<i>Microvirga</i>	0	7	3	1	3	3	4	2	6
328	<i>Nannocystis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
329	<i>Nevskia</i>	0	0	2	0	2	0	6	1	0
330	<i>Niabella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2
331	<i>Nocardia</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	2
332	<i>Nonomuraea</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
333	<i>Paludibacter</i>	0	1	43	0	0	0	14	0	0
334	<i>Pandoraea</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
335	<i>Parabacteroides</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0
336	<i>Parachlamydia</i>	0	5	2	3	2	0	0	0	0
337	<i>Parvibaculum</i>	0	2	3	0	0	2	0	0	0
338	<i>Paucimonas</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0
339	<i>Phaselicystis</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	0
340	<i>Phycococcus</i>	0	3	3	1	0	0	0	1	4
341	<i>Phycisphaera</i>	0	1	1	0	0	0	0	2	0
342	<i>Planococcaceae _incertae_sedis</i>	0	3	2	0	0	0	0	1	0
343	<i>Plantibacter</i>	0	4	0	0	0	0	1	0	0
344	<i>Pontibacter</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0
345	<i>Porticoccus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
346	<i>Prolixibacter</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
347	<i>Promicromonospora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
348	<i>Propionibacterium</i>	0	1	0	0	0	0	1	1	3
349	<i>Pseudorhodoferax</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0
350	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0	2	0	0	0	0	0	1	4
351	<i>Pusillimonas</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0
352	<i>Rhodomicrobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
353	<i>Rhodoplanes</i>	0	1	0	4	3	5	1	1	1
354	<i>Rhodopseudomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
355	<i>Rickettsia</i>	0	0	3	0	1	0	0	0	0
356	<i>Rikenella</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0
357	<i>Roseomonas</i>	0	7	3	2	2	3	5	0	1
358	<i>Rubellimicrobium</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0
359	<i>Rubroacter</i>	0	0	1	55	5	0	0	12	8
360	<i>Rudaea</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0
361	<i>Runella</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
362	<i>Saccharofermentans</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0
363	<i>Saccharomonospora</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
364	<i>Salinibacter</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
365	<i>Shewanella</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
366	<i>Simkania</i>	0	0	0	2	2	0	0	0	0
367	<i>Singulisphaera</i>	0	3	1	1	2	1	5	3	2
368	<i>Smaragdicoccus</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
369	<i>Solimonas</i>	0	0	1	2	2	1	2	3	14

370	<i>Sorangium</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	1
371	<i>Sphaerisporangium</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0
372	<i>Sphaerotilus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
373	<i>Sphingobacterium</i>	0	5	0	0	0	0	0	0	0
374	<i>Sphingopyxis</i>	0	6	0	0	0	0	0	0	2
375	<i>Sphingosinicella</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
376	<i>Sporichthya</i>	0	4	0	1	1	0	1	4	2
377	<i>Sporocytophaga</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
378	<i>Sporosarcina</i>	0	0	1	1	0	0	4	0	2
379	<i>Starkeya</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
380	<i>Streptococcus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
381	<i>Streptophyta</i>	0	3	0	0	0	2	1	1	1
382	<i>Subdivision5 _genera_incertae_sedis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
383	<i>Subtercola</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
384	<i>Sulfuricurvum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
385	<i>Sulfuritalea</i>	0	0	16	0	2	3	41	1	0
386	<i>Sulfurospirillum</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0
387	<i>Sulfurovum</i>	0	0	11	0	0	0	0	0	0
388	<i>Symbiobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
389	<i>Thauera</i>	0	0	9	0	0	0	7	0	0
390	<i>Thermoactinomyces</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
391	<i>Thermoleophilum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
392	<i>Thermomonas</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
393	<i>Thiobacillus</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0
394	<i>Treponema</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	0
395	<i>Tumebacillus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
396	<i>Vampirovibrio</i>	0	3	0	4	1	0	1	4	2
397	<i>Verrucomicrobium</i>	0	0	2	3	3	0	0	0	1
398	<i>Victivallis</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0
399	<i>Virgisporangium</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2
400	<i>Wautersiella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
401	<i>Xenophilus</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0
402	<i>Yersinia</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
403	<i>Zoogloea</i>	0	0	1	3	0	0	1	0	0
	Total	5.580	5.000	4.423	5.374	4.975	4.574	4.587	5.028	4.782

4.5.3. Diversidad bacteriana en las muestras de las librerías L-SR y L-SNR

La biodiversidad alpha en las diferentes muestras de las librerías L-SR y L-SNR se estimaron calculando los índices de Shannon, Chao1, ACE, Simpson, Jackknife, y sus correspondientes índices de cobertura, índice de cobertura contenidos en el software SPADE, los que se indican en la Tabla 4.17 y 4.18, respectivamente. Las curvas de rarefacción y equidad se calcularon a través de RDP (Figura 4.12 y 4.13; Tabla 4.17 y 4.18, respectivamente). Los índices basados en el número total de OTUs, como ACE y Chao1, sugieren que existe una elevada biodiversidad en todas las muestras (Tabla 4.17 y 4.18, respectivamente). El resto de índices, basados en la probabilidad de aparición de nuevos OTUs, también indicaron que existe una elevada diversidad (Tabla 4.17 y 4.18, respectivamente). En todas las muestras analizadas, el índice de cobertura varió entre el 85,8% y el 90,04%. Los valores de equidad fueron superiores a 0.8, lo que indica la ausencia general de dominancia por parte de un OTU. Las curvas de rarefacción correspondientes a cada librería (Figuras 4.12 y 4.13, respectivamente) se construyeron utilizando los valores de rarefacción obtenidos mediante el comando “*Rarefaction*” del RDP que utiliza las secuencias ya agrupadas mediante el comando “*Clustering*”. Estos resultados, junto con los de los índices de cobertura, indican que la biodiversidad de las muestras está estadísticamente bien representada.

Tabla 4.17. Número de secuencias (S), número de OTUs, valores de rarefacción e índices de diversidad determinadas en las muestras de la librería L-SR

Muestra de L-SR	S	OTUs	Rarefacción	ACE	Chao1	Simpson	Shannon (H')	Jackknife	Equidad	% Índice cobertura
MT-SR	9.966	1.982	1.981,33	4.292,7	4.098,62	0,01252	6,041	6,203	0,79582	88,78
T-SR	9.966	2.264	2.263,28	4.413,9	4.236,91	0,0031	6,733	6,913	0,87164	88,00
MF-SR	9.966	2.398	2.397,17	5.092,2	4.718,94	0,01447	6,245	6,442	0,80249	86,20
M-SR	9.966	2.515	2.514,15	5.257,6	4.993,88	0,00894	6,634	6,838	0,84726	85,81

El intervalo de confianza para cada uno de los índices fue del 95%.

Tabla 4.18. Número de secuencias (S), número de OTUs, valores de rarefacción e índices de diversidad determinadas en las muestras de la librería L-SNR

Muestra de L-SNR	S	OTUs	Rarefacción	ACE	Chao1	Simpson	Shannon (H')	Jackknife	Equidad	% Índice cobertura
MT-SNR	9966	2447	2.446,24	4.554,70	4.487,74	0,00287	6,864	7,058	0,87980	87,28
T-SNR	9966	1963	1.962,39	3.685,40	3.575,10	0,01422	6,105	6,261	0,80523	89,75
MF-SNR	9966	2313	2.312,27	4.372,60	4.146,05	0,00764	6,500	6,690	0,83900	87,79
M-SNR	9966	2228	2.227,29	3.632,90	3.549,59	0,00485	6,733	6,904	0,87342	89,75
D	9966	2149	2.148,40	3.597,60	3.503,09	0,00289	6,765	6,931	0,88182	90,04

El intervalo de confianza para cada uno de los índices fue del 95%.

Figura 4.12. Curvas de rarefacción de las muestras de la librería L-SR. Se utilizó el número de OTUs asignado en el “Clustering” del RDP al 97.0% de similitud. Color azul: muestra MT-SR; color verde: muestra T-SR; color rojo: muestra ME-SNR; color morado: muestra M-SNR.

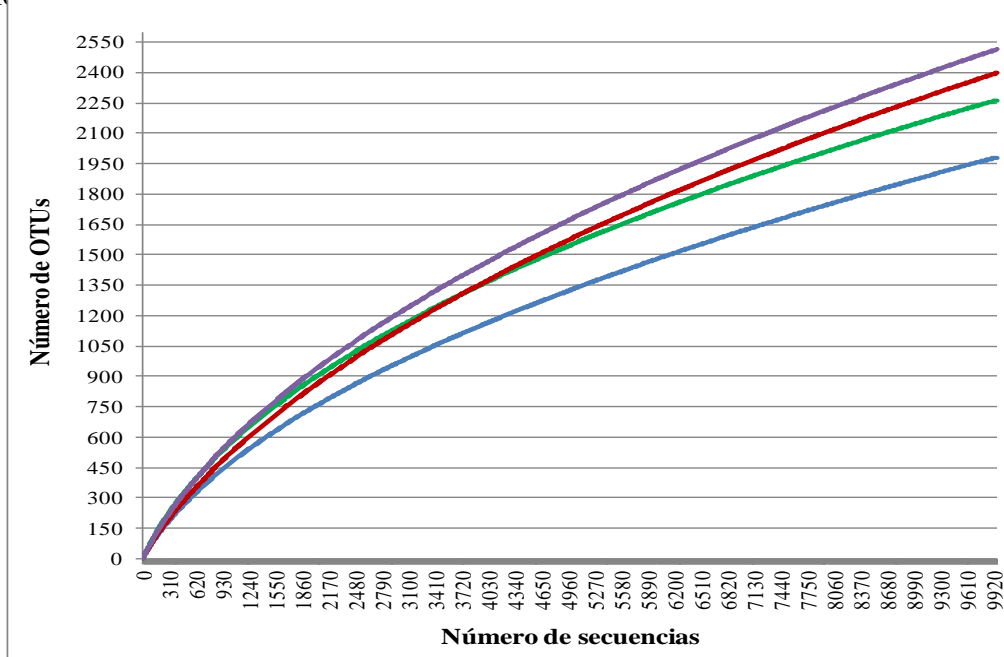
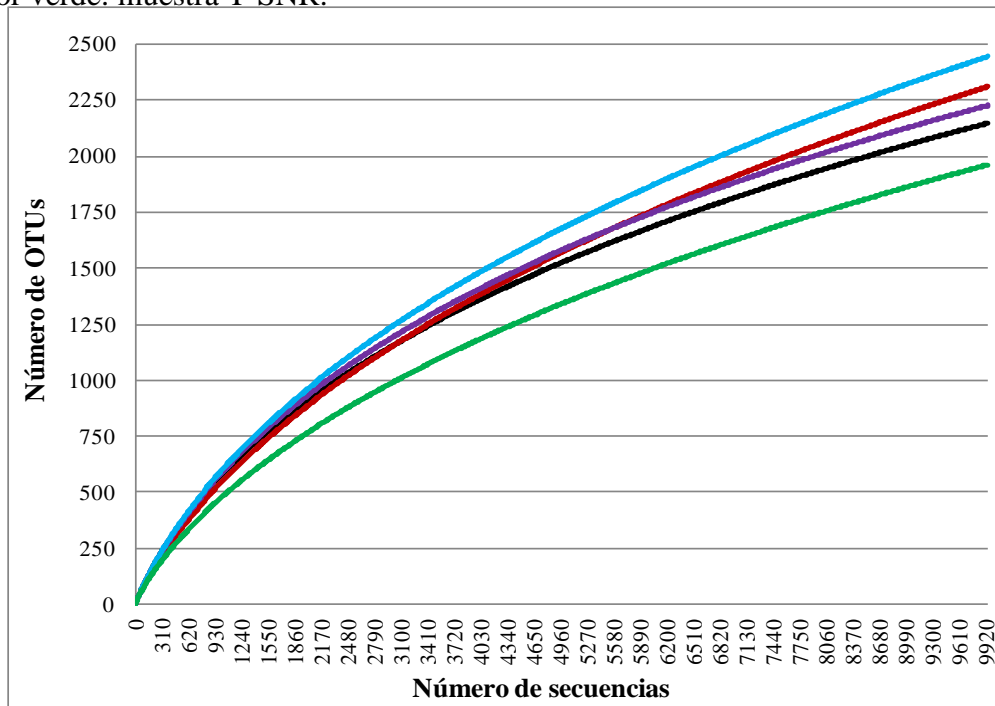


Figura 4.13. Curvas de rarefacción de las muestras de la librería L-SNR. Se utilizó el número de OTUs asignado en el “Clustering” del RDP al 97.0% de similitud. Color celeste: muestra MT-SNR; color rojo: muestra MF-SNR; color morado: muestra M-SNR; color negro: muestra D y color verde: muestra T-SNR.



Los índices Jaccard y Sorensen, que estiman la biodiversidad beta, indicaron que las muestras de las librerías L-SR y L-SNR no tienen la misma composición, aunque comparten

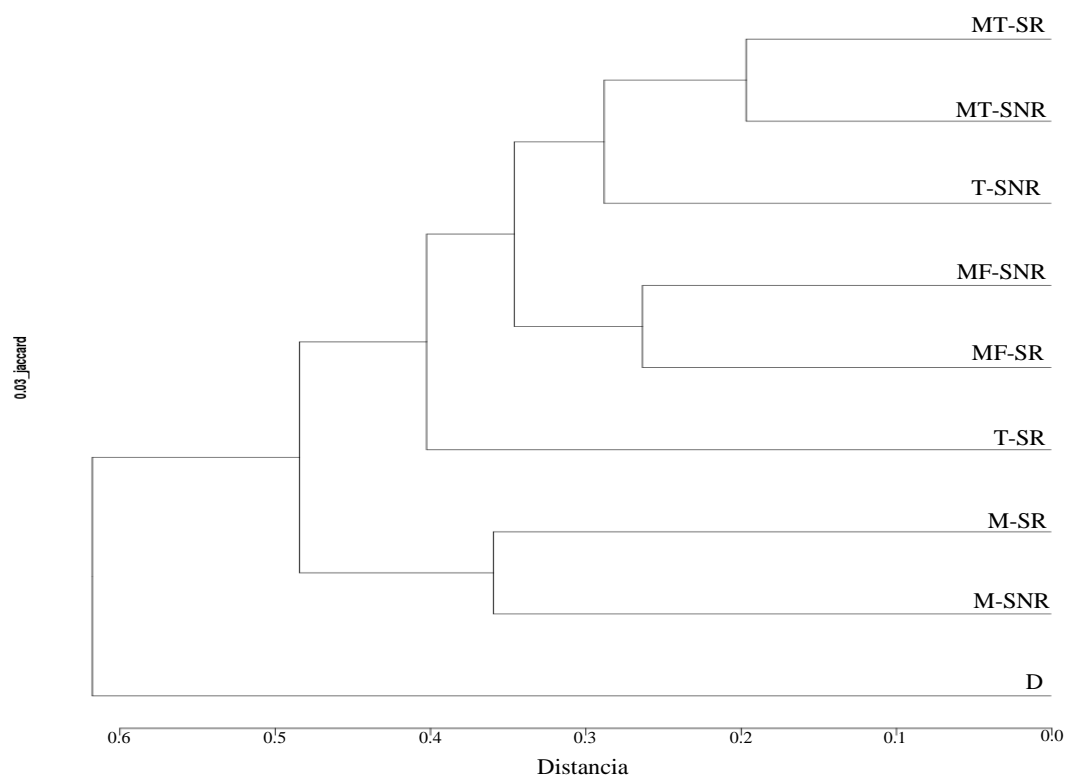
diversas OTUs. Los índices de Jaccard para las comparaciones entre las distintas muestras oscilaron entre 0,196 y 0,758, lo que sugiere que las muestras comparten algunos OTUs (Tabla 4.19). Excepto para las muestras de maíz procedentes tanto de suelo rizosférico como no rizosférico, los índices de la muestra D fueron los más elevados en relación con el resto de muestras, lo que indica que tales muestras comparten un elevado número de OTUs (Tabla 4.19).

Tabla 4.19. Índices de Jaccard de las muestras de las librerías L-SR y L-SNR

	MF-SR	MT-SNR	MT-SR	T-SR	M-SNR	M-SR	T-SNR	MF-SNR	D
MF-SR	0,000	0,386	0,381	0,504	0,480	0,573	0,382	0,263	0,758
MT-SNR	0,386	0,000	0,196	0,426	0,435	0,503	0,337	0,318	0,559
MT-SR	0,381	0,196	0,000	0,366	0,484	0,507	0,239	0,297	0,669
T-SR	0,504	0,426	0,366	0,000	0,549	0,477	0,306	0,409	0,661
M-SNR	0,480	0,435	0,484	0,549	0,000	0,359	0,417	0,435	0,422
M-SR	0,573	0,503	0,507	0,477	0,359	0,000	0,476	0,473	0,567
T-SNR	0,382	0,337	0,239	0,306	0,417	0,476	0,000	0,311	0,657
MF-SNR	0,263	0,318	0,297	0,409	0,435	0,473	0,311	0,000	0,648
D	0,758	0,559	0,669	0,661	0,422	0,567	0,657	0,648	0,000

El cladograma obtenido a partir de la matriz de distancia que genera RDP utilizando el comando “*Jaccard-Sorensen*” se presenta en la Figura 4.14. En ella se puede observar que la muestra D es la que comparte el mayor número de OTUs con el resto de muestras.

Figura 4.14. Cladograma basado en los índices de Jaccard de las muestras de las librerías L-S.

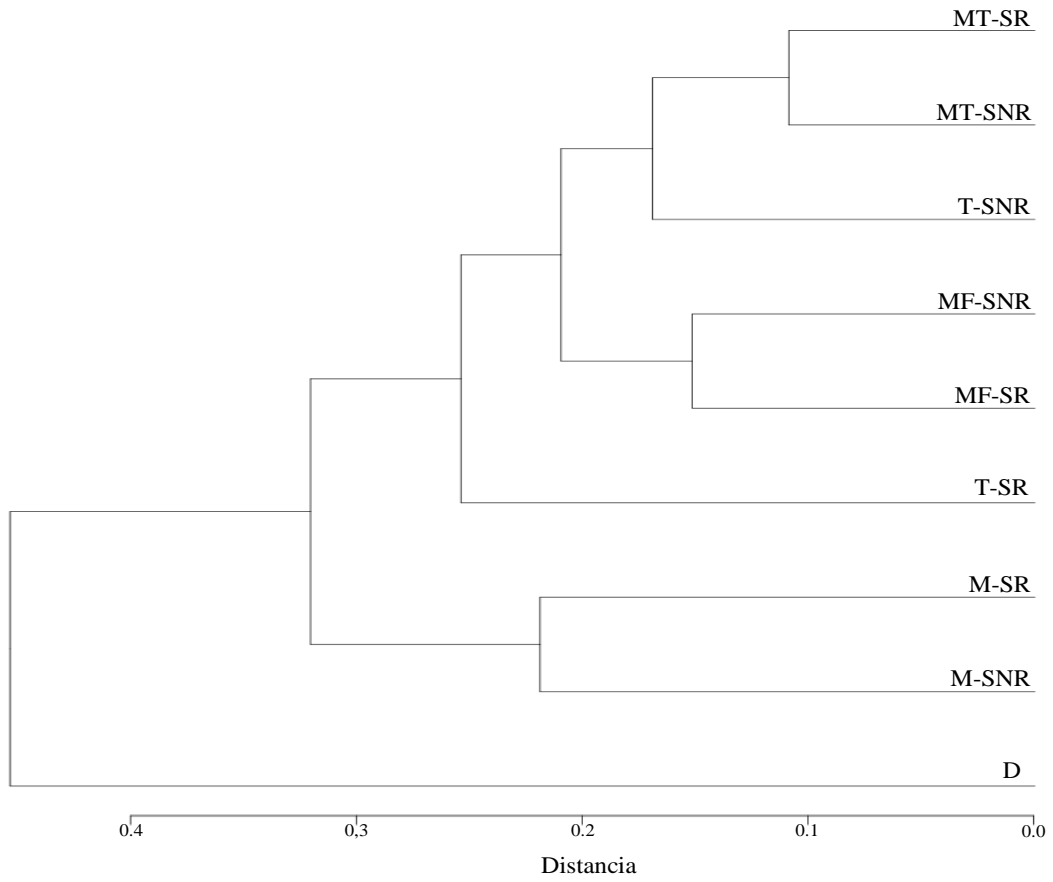


Cuando las relaciones entre las muestras de ambas librerías se analizaron utilizando el índice de Sorensen (Tabla 4.20), los resultados fueron similares a los obtenidos con los del índice de Jaccard. Igualmente, el cladograma correspondiente mostró que, de nuevo, los índices binarios de la muestra D fueron los más elevados (Figura 4.15).

Tabla 4.20. Índices de Sorensen de las muestras de las librerías L-SR y L-SNR

	MF-SR	MT-SNR	MT-SR	T-SR	M-SNR	M-SR	T-SNR	MF-SNR	D
MF-SR	0,000	0,240	0,235	0,337	0,316	0,401	0,236	0,152	0,610
MT-SNR	0,240	0,000	0,109	0,271	0,278	0,336	0,202	0,189	0,388
MT-SR	0,235	0,109	0,000	0,224	0,319	0,340	0,136	0,174	0,503
T-SR	0,337	0,271	0,224	0,000	0,378	0,314	0,180	0,257	0,493
M-SNR	0,316	0,278	0,319	0,378	0,000	0,219	0,263	0,278	0,267
M-SR	0,401	0,336	0,340	0,314	0,219	0,000	0,312	0,310	0,396
T-SNR	0,236	0,202	0,136	0,180	0,263	0,312	0,000	0,184	0,490
MF-SNR	0,152	0,189	0,174	0,257	0,278	0,310	0,184	0,000	0,480
D	0,610	0,388	0,503	0,493	0,267	0,396	0,490	0,480	0,000

Figura 4.14. Cladograma basado en los índices de Sorensen de las muestras de las librerías L-SR y L-SNR



4.5.4. Análisis comparativo de la estructura de las poblaciones microbianas en las muestras de las librerías L-SR y L-SNR

4.5.4.1. Análisis de los suelos rizosféricos

Para estimar las diferencias en la estructura de las comunidades microbianas de las muestras del suelo rizosférico se empleó el comando Libshuff del programa MOTHUR. Las comparaciones entre las muestras fueron significativamente diferentes ($P < 0,0001$) cuando se analizaron los suelos rizosféricos en ambas direcciones (Tabla 4.21), lo que indica que las poblaciones microbianas de cada suelo son diferentes.

Tabla 4.21. Significación de las comparaciones entre las secuencias del gen 16S rRNA de las muestras de suelos rizosféricos a partir de la librería L-SR

Muestras	dCXY score	<i>P</i> (significación)
M-SR vs MF-SR	0,002397	<0,0001
M-SR vs MT-SR	0,002879	<0,0001
M-SR vs T-SR	0,002194	<0,0001
MF-SR vs M-SR	0,003456	<0,0001
MF-SR vs MT-SR	0,001789	<0,0001
MF-SR vs T-SR	0,002585	<0,0001
MT-SR vs M-SR	0,002072	<0,0001
MT-SR vs MF-SR	0,000511	<0,0001
MT-SR vs T-SR	0,000474	<0,0001
T-SR vs M-SR	0,003784	<0,0001
T-SR vs MF-SR	0,002509	<0,0001
T-SR vs MT-SR	0,001889	<0,0001

El valor *P* crítico para las 4 muestras de suelo es de 0,004167 con un valor α de 0.05 para las comparaciones entre las 12 parejas analizadas

4.5.4.2. Análisis de los suelos no rizosféricos

En contraste con los suelos rizosféricos, la estructura de las poblaciones microbianas de los suelos no rizosféricos no fueron significativamente ($\alpha = 0.05$) diferentes en algunas comparaciones, sobre todo aquellas en las que interviene la muestra D (Tabla 4.22).

Tabla 4.22. Significación de las comparaciones entre las secuencias del gen 16S rRNA de las muestras de suelos rizosféricos a partir de la librería L-SNR.

Comparación	dCXY score	P (significación)
D vs MF-SNR	0,00384134	< 0,0001
D vs M-SNR	0,00214498	< 0,0001
D vs MT-SNR	0,00297239	< 0,0001
D vs T-SNR	0,00512707	< 0,0001
M-SNR vs D	0,00220156	< 0,0001
M-SNR vs MF-SNR	0,00173256	<0,0001
M-SNR vs MT-SNR	0,00162448	<0,0001
M-SNR vs T-SNR	0,00214766	<0,0001
MF-SNR vs D	0,00853581	<0,0001
MF-SNR vs M-SNR	0,00356003	<0,0001
MF-SNR vs MT-SNR	0,00065082	<0,0001
MF-SNR vs T-SNR	0,00104318	<0,0001
MT-SNR vs D	0,00549609	<0,0001
MT-SNR vs MF-SNR	0,00054630	<0,0001
MT-SNR vs M-SNR	0,00257943	<0,0001
MT-SNR vs T-SNR	0,00113558	<0,0001
T-SNR vs D	0,00847383	<0,0001
T-SNR vs MF-SNR	0,00024420	<0,0001
T-SNR vs M-SNR	0,00388696	<0,0001
T-SNR vs MT-SNR	0,00036827	<0,0001

El valor *P* crítico para las 5 muestras de suelo es de 0,0025 con un valor α de 0.05 para las comparaciones entre las 20 parejas analizadas

4.5.4.3. Análisis de los suelos no rizosféricos vs suelos rizosféricos

En todos los casos, independientemente del cultivo establecido, la estructura de las poblaciones microbianas procedentes de cada uno de los suelos rizosféricos fueron estadísticamente diferentes a la de los correspondientes suelos no rizosféricos (Tabla 4.23).

Tabla 4.23. Significación de las comparaciones entre las secuencias del gen 16S rRNA de las muestras de suelos rizosféricos y no rizosféricas

Comparación	dCXY score	P (significación)
MF-SR vs MF-SNR	0,00023468	<0,0001
MF-SNR vs MF-SR	0,00031015	<0,0001
M-SR vs M-SNR	0,00057589	<0,0001
M-SNR vs M-SR	0,00027499	<0,0001
MT-SR vs MT-SNR	0,00001509	<0,0001
MT-SNR vs MT-SR	0,00035850	<0,0001
T-SR vs T-SNR	0,00043109	<0,0001
T-SNR vs T-SR	0,00032827	<0,0001

El valor *P* crítico para las 4 muestras de suelo es de 0,00625 con un valor α de 0.05 para las comparaciones entre las 8 parejas analizadas

4.5.4.4. Análisis taxonómico comparado de las poblaciones microbianas en suelos rizosféricos y no rizosféricos

Se llevó a cabo mediante el comando “*Library Compare*” utilizando las secuencias de las muestras de las librerías L-SR y L-SNR. En las Tablas 4.24, 4.25, 4.26 y 4.27, sólo se presentan los géneros significativamente diferentes ($P = 0.01$) identificados en ambos tipos de suelo.

4.5.4.4.1. Suelos cultivados con maíz y trébol (muestras MT-SR y MT-SNR)

En la muestra MT-SR se identificaron 199 géneros y 196 en la muestra MT-SNR (Tabla 4.24). *Flavobacterium*, *Dechloromonas*, *Acidovorax*, *Bacillus* y *Arenimonas* son los géneros más abundantes en SR y su presencia en SNR fue significativamente menor (Tabla x). En SNR los géneros *Oxalicibacterium* y *Magnetospirillum* fueron mayoritarios, y más abundantes que en SR.

Tabla 4.24. Géneros y número de secuencias en SR y SNR de maíz y trébol

Género	MT-SR	MT-SNR	Valor de significación*
<i>Flavobacterium</i>	1.184	548	6,000E-14
<i>Dechloromonas</i>	1.161	75	6,000E-14
<i>Acidovorax</i>	246	21	6,000E-14
<i>Bacillus</i>	209	12	6,000E-14
<i>Arenimonas</i>	193	107	5,740E-07
<i>Gp4</i>	191	396	6,000E-14

<i>Gp6</i>	181	317	1,060E-09
<i>Gemmatimonas</i>	174	350	6,000E-14
<i>Clostridium III</i>	107	44	3,400E-07
<i>Opitutus</i>	89	149	1,000E-04
<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	86	372	6,000E-14
<i>Fluviicola</i>	43	87	1,000E-04
<i>Nitrospira</i>	40	75	1,080E-03
<i>Gp3</i>	38	85	2,670E-05
<i>Geobacter</i>	37	87	6,800E-06
<i>Gracilibacter</i>	33	72	1,400E-04
<i>Gp7</i>	32	72	8,000E-05
<i>Sphingomonas</i>	26	59	3,400E-04
<i>Anaerovorax</i>	24	4	1,040E-04
<i>ODI_genera_incertae_sedis</i>	22	92	8,070E-11
<i>Steroidobacter</i>	19	57	1,710E-05
<i>Magnetospirillum</i>	16	126	6,000E-14
<i>Spartobacteria_genera_incertae_sedis</i>	15	64	3,810E-08
<i>Sphingobium</i>	14	2	2,350E-03
<i>Roseateles</i>	14	3	7,540E-03
<i>Oxalicibacterium</i>	12	166	6,000E-14
<i>Haliangium</i>	10	31	1,040E-03
*Significativamente diferente a $P = 0,01$			

4.5.4.4.2. Suelos cultivados con trébol (muestras T-SR y T-SNR)

En la muestra T-SR se identificaron 221 géneros y 181 en la muestra T-SNR (Tabla 4.25). Los géneros identificados en SR y SNR de trébol fueron, en general, diferentes a los encontrados en maíz (Tabla 4.24). Los géneros *Pedobacter*, *Clostridium*, *Arenimonas*, *Mucilaginibacter*, *Opitutus*, *Novosphingobium*, *Phenylobacterium*, *Rhizomicrobium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas* y *Rhodanobacter* se encuentran en ambos suelos, pero el número de secuencias fue significativamente superior en SR. Hay que destacar que, en general, el número de secuencias en la rizosfera y en el suelo no rizosférico de trébol fueron inferiores a los de maíz (Tablas 4.25 y 4.24). Aunque las Acidobacterias (*Gp4* y *Gp6*) aparecieron en ambos suelos, fueron más abundantes en SNR (Tabla 4.25).

Tabla 4.25. Géneros y número de secuencias en SR y SNR de trébol

Genero	T-SR	T-SNR	Valor de significación*
<i>Flavobacterium</i>	485	605	1,80E-04
<i>Gp4</i>	325	408	1,80E-03
<i>Pedobacter</i>	197	6	6E-14
<i>Clostridium sensu stricto</i>	190	34	6E-14

<i>Arenimonas</i>	180	107	1,71E-05
<i>Mucilaginibacter</i>	169	18	6E-14
<i>Gp6</i>	157	240	2,67E-05
<i>Opitutus</i>	112	53	4,23E-06
<i>Novosphingobium</i>	107	17	6E-14
<i>Phenylobacterium</i>	99	43	2,60E-06
<i>Rhizomicrobium</i>	93	26	1,06E-09
<i>Paenibacillus</i>	86	0	1,29E-26
<i>Sphingomonas</i>	78	7	6E-14
<i>Rhodanobacter</i>	72	5	1,50E-16
<i>Acidovorax</i>	63	115	0,00008
<i>Geothrix</i>	47	0	7,11E-15
<i>Variovorax</i>	45	9	9,60E-07
<i>Polaromonas</i>	42	3	4,62E-10
<i>Devosia</i>	41	15	0,0005
<i>Massilia</i>	41	68	9,60E-03
<i>Dechloromonas</i>	37	340	6E-14
<i>Brevundimonas</i>	35	2	5,40E-09
<i>Dyadobacter</i>	35	3	3,61E-08
<i>Methylophilus</i>	34	13	2,14E-03
<i>Clostridium III</i>	32	105	5,67E-10
<i>Aeromicrobium</i>	31	2	6,94E-08
<i>Dyella</i>	28	0	3,73E-09
<i>Oxalicibacterium</i>	19	161	6E-14
<i>Ensifer</i>	18	0	3,81E-06
<i>Rhizobium</i>	18	2	2,21E-04
<i>Albidiferax</i>	17	67	6,68E-08
<i>Duganella</i>	17	40	2,28E-03
<i>Stenotrophomonas</i>	16	3	2,58E-03
<i>Gracilibacter</i>	13	94	6E-14
<i>Geobacter</i>	13	65	3,65E-09
<i>Undibacterium</i>	4	45	4,46E-10
<i>Magnetospirillum</i>	1	128	1,92E-37
<i>Holophaga</i>	0	126	1,18E-38
<i>Azonexus</i>	0	51	4,44E-16
*Significativamente diferente a $P = 0,01$			

4.5.4.4.3. Suelos cultivados con maíz fertilizado (muestras MF-SR y MF-SNR)

El número de géneros en la rizosfera y en suelo no rizosférico de las plantas de maíz fertilizado fue 212 en ambos casos (Tabla 4.26). El número de secuencias de los géneros *Dechloromonas*, *Geobacter*, *Clostridium III*, *Albidiferax* y *Methylophilus* de MF-SR son

significativamente diferentes para los mismos géneros del suelo SNR. En cambio los géneros *Flavobacterium*, *Gp4*, *Opitutus*, *Gemmatimonas*, *Massilia*, *Fluviicola*, *Gp7*, *Bacillus* y *Variovorax* fueron estadísticamente más abundantes en el SNR de maíz cultivado con fertilización química.

Tabla 4.26. Géneros y número de secuencias en SR y SNR de maíz fertilizado

Género	MF-SR	MF-SNR	Valor de significación*
<i>Dechloromonas</i>	1.024	620	6,00E-14
<i>Geobacter</i>	342	136	6,00E-14
<i>Flavobacterium</i>	212	403	6,00E-14
<i>Gp4</i>	147	305	6,00E-14
<i>Opitutus</i>	132	211	1,71E-05
<i>Clostridium III</i>	131	82	7,20E-04
<i>Albidiferax</i>	125	4	1,72E-32
<i>Gemmatimonas</i>	113	325	6,00E-14
<i>Methylophilus</i>	67	12	5,67E-10
<i>Azoarcus</i>	49	5	2,14E-10
<i>Azonexus</i>	49	20	4,60E-04
<i>Paludibacter</i>	43	14	1,20E-04
<i>Massilia</i>	42	136	2,58E-12
<i>Polaromonas</i>	40	14	4,00E-04
<i>Anaerorhabdus</i>	31	1	7,92E-09
<i>Propionivibrio</i>	30	13	9,32E-03
<i>Pseudomonas</i>	26	4	3,40E-05
<i>Arcobacter</i>	21	0	4,77E-07
<i>Mucilaginibacter</i>	18	42	1,94E-03
<i>Fluviicola</i>	16	91	6,00E-13
<i>Gp7</i>	16	59	9,60E-07
<i>Sulfuritalea</i>	16	41	9,00E-04
<i>Bacillus</i>	15	131	6,00E-14
<i>Acidovorax</i>	13	43	6,34E-05
<i>Variovorax</i>	12	91	6,00E-14
<i>Sulfurovum</i>	11	0	4,88E-04
<i>Pelosinus</i>	10	34	3,00E-04
<i>Anaerovorax</i>	9	24	9,06E-03
<i>Undibacterium</i>	7	44	3,40E-07
<i>Ferruginibacter</i>	6	20	5,96E-03
<i>Pedobacter</i>	5	23	5,46E-04
<i>Chitinophaga</i>	0	19	1,91E-06
<i>Pseudolabrys</i>	0	7	7,81E-03
*Significativamente diferente a $P = 0,01$			

4.5.4.4.4. Suelos cultivados con maíz (muestras M-SR y M-SNR)

El número de géneros en las muestras M-SR y M-SNR fue de 209 y 183, respectivamente (Tabla 4.27). Los géneros *Rhodoferax*, *Rhizobium*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Ohtaekwangia*, *Bacillus*, *Mucilaginibacter* y *Gp1* son significativamente más abundantes en SR que en SNR. Los géneros *Gemmatimonas*, *Gp6*, *Gp4*, *Haliangium*, *Gp7*, *Phenylobacterium*, *Nitrospira*, *Gp5*, *Terrimonas*, *Gp3*, *Opitutos* y *Sterioidebacter* fueron, por el contrario, más abundantes en el suelo M-SNR.

Tabla 4.27. Géneros y número de secuencias en SR y SNR de maíz

Género	M-SR	M-SNR	Valor de significación*
<i>Rhodoferax</i>	767	0	1,29E-231
<i>Rhizobium</i>	66	2	8,19E-18
<i>Chryseobacterium</i>	51	0	4,44E-16
<i>Flavobacterium</i>	158	37	6,00E-14
<i>Gemmatimonas</i>	168	485	6,00E-14
<i>Gp6</i>	349	622	6,00E-14
<i>Hydrogenophaga</i>	36	0	1,46E-11
<i>Gp4</i>	1.125	1.434	8,07E-11
<i>Ohtaekwangia</i>	255	129	1,56E-10
<i>Bacillus</i>	80	19	1,06E-09
<i>Pedobacter</i>	33	2	1,94E-08
<i>Pseudomonas</i>	35	3	3,61E-08
<i>Rubrobacter</i>	55	12	2,00E-07
<i>Haliangium</i>	43	103	9,60E-07
<i>Lysobacter</i>	8	42	1,59E-06
<i>Geobacter</i>	27	3	4,65E-06
<i>Mucilaginibacter</i>	72	27	6,80E-06
<i>Novosphingobium</i>	16	0	1,53E-05
<i>Gp7</i>	49	100	4,13E-05
<i>Phenylobacterium</i>	26	63	8,00E-05
<i>Gp1</i>	71	33	1,80E-04
<i>Arenimonas</i>	15	43	2,40E-04
<i>Janthinobacterium</i>	12	0	2,44E-04
<i>Undibacterium</i>	15	1	2,75E-04
<i>Nitrospira</i>	23	51	1,12E-03
<i>Gp5</i>	35	67	1,48E-03
<i>Nocardioides</i>	10	30	1,52E-03
<i>Anaeromyxobacter</i>	25	8	3,08E-03
<i>Terrimonas</i>	34	63	3,18E-03
<i>Segetibacter</i>	17	39	3,28E-03
<i>Gp3</i>	63	99	4,52E-03

<i>Solirubrobacter</i>	16	36	5,44E-03
<i>Pasteuria</i>	37	17	6,34E-03
<i>Flavisolibacter</i>	22	44	6,72E-03
<i>Opitutus</i>	98	139	7,36E-03
<i>Steroidobacter</i>	30	54	8,80E-03
*= Significativamente diferente a 0,01			

4.6. Aislamiento e identificación de endofitos de las raíces de maíz amiláceo

4.6.1. Método dependiente de cultivo celular

Entre los 3 cultivos, después de la incubación en medio YEM del extracto obtenido de las raíces de maíz, se obtuvieron 10 UFCs morfológicamente diferentes. Después de la amplificación y secuenciación parcial del gen 16 rRNA de cada una de las cepas, la búsqueda de secuencias homólogas depositadas en los Bancos de Datos mediante el programa BLASTN mostró que 8 de las 10 cepas aisladas pertenecían al género *Bacillus*, 1 a *Dyella* y otra a *Enterobacter*.

4.6.2. Método independiente de cultivo celular: Pirosecuenciación

Las secuencias recibidas de Life Sequencing S.A. se procesaron de la manera descrita en el apartado 4.2. Durante su limpieza (cualificación) se observó la presencia de abundantes secuencias correspondientes a estreptofitas (68,65%) y mitocondrias (20,01%), que se eliminaron de la librería L-EMT. Las 5.779 secuencias restantes (11,32%) corresponden a ADN bacteriano (Tabla 4.28).

Tabla 4.28. Número y porcentaje de secuencias totales, cualificadas, de estreptofitas, de mitocondrias y de endofitos de la librería L-EMT.

Muestra	Número de secuencias en la librería L-EMT				
	Total	Cualificadas	Estreptofitas	Mitocondrias	Endofitos
MT	62.475	51.046	35.050 (68,67%)	10.217 (20,01%)	5.779 (11,32%)

El tamaño molecular medio de las secuencias fue de 371 pb y su alineamiento con el comando “*Aligner*” mostró que el inicio y el final de las secuencias coincidía, en la mayoría de los casos, con las posiciones de los nucleótidos 537 y 906 del gen 16S rRNA de *E. coli* (J01695) que se utilizó como referencia. No se detectó ningún hueco (gap) en el alineamiento. Una vez alineadas, las secuencias se agruparon (97% de similitud) mediante el comando “*Clustering*” para generar el número de OTUs, que fue de 618. El comando “*Classifier*” permitió la asignación de las secuencias en las categorías taxonómicas de phyla, clase, orden, familia y género (Tabla 4.29).

Tabla 4.29. Clasificación de las secuencias de la librería L-EMT. Se indica la categoría taxonómica, el número de taxa (N), el número de secuencias (S) y el porcentaje de las mismas.

Categoría taxonómica	N	S
Phyla	14	5.773 (99,90%)
Clase	35	5.724 (99,05%)
Orden	43	5.157 (89,24%)
Familia	88	5.002 (86,55%)
Género	180	2.051 (35,50%)
Secuencias no clasificadas		4 (0,07%)

4.6.3. Clasificación y composición de los endofitos de las raíces de maíz

Mediante pirosecuenciación se han detectado 12 phyla pertenecientes al dominio bacteria y 2 al Archaea en el interior de las raíces de maíz. Proteobacteria fue mayoritaria en Bacteria ya que incluyó el 84,39% de las secuencias, seguida de Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Acidobacteria. Los phyla Crenarchaeota y Euryarchaeota estuvieron representados por 4 y 3 secuencias, respectivamente, lo que representó el 0,12% de las secuencias (Tabla 4.30),.

Tabla 4.30. Distribución en phyla de las secuencias de la librería L-EMT

Phyla	Número de secuencias
Proteobacteria	4.877 (84,39%)
Firmicutes	248 (4,29%)
Actinobacteria	233 (4,03%)
Bacteroidetes	212 (3,67%)
Acidobacteria	116 (2,01%)
Verrucomicrobia	37 (0,64%)
Gemmatimonadetes	17 (0,29%)
Planctomycetes	11 (0,19%)
Chloroflexi	7 (0,12%)
Crenarchaeota	4 (0,07%)
TM7	4 (0,07%)
Euryarchaeota	3 (0,05%)
Chlamydiae	2 (0,03%)
Nitrospira	2 (0,03%)
Secuencias no clasificadas	4 (0,07%)

Los 14 phyla de la librería L-EMT se distribuyeron en 35 clases, 43 órdenes, 88 familias y 180 géneros (Tabla 4.31)

Tabla 4.31. Géneros identificados, y su número de secuencias, en las librerías L-EMT. Se indica el número de secuencias y el porcentaje de las mismas

Género	Número de secuencias
<i>Sphingomonas</i>	303 (5,24%)
<i>Burkholderia</i>	191 (3,31%)
<i>Sphingobium</i>	148 (2,56%)
<i>Streptococcus</i>	142 (2,46%)
<i>Herbaspirillum</i>	78 (1,35%)
<i>Bradyrhizobium</i>	66 (1,14%)
<i>Methylophilus</i>	60 (1,04%)
<i>Propionibacterium</i>	57 (0,99%)
<i>Haemophilus</i>	53 (0,92%)
<i>Dyella</i>	37 (0,64%)
<i>Chitinophaga</i>	36 (0,62%)
<i>Rhizobium</i>	36 (0,62%)
<i>Gp4</i>	34 (0,59%)
<i>Gp6</i>	28 (0,48%)
<i>Caulobacter</i>	27 (0,47%)
<i>Mucilaginibacter</i>	26 (0,45%)
<i>Duganella</i>	25 (0,43%)
<i>Methylovorus</i>	23 (0,40%)
<i>Pseudomonas</i>	21 (0,36%)
<i>Ohtaekwangia</i>	20 (0,35%)
<i>Pleomorphomonas</i>	19 (0,33%)
<i>Staphylococcus</i>	19 (0,33%)
<i>Bacillus</i>	18 (0,31%)
<i>Gemmatimonas</i>	17 (0,29%)
<i>Pedobacter</i>	17 (0,29%)
<i>Acidovorax</i>	16 (0,28%)
<i>Phenylobacterium</i>	16 (0,28%)
<i>Streptomyces</i>	15 (0,26%)
<i>Gp3</i>	14 (0,24%)
<i>Spartobacteria_genera_incertae_sedis</i>	14 (0,24%)
<i>Azospirillum</i>	14 (0,24%)
<i>Devosia</i>	13 (0,22%)
<i>Bosea</i>	12 (0,21%)
<i>Opitutus</i>	11 (0,19%)
<i>Methylobacterium</i>	10 (0,17%)
<i>Rhizobacter</i>	10 (0,17%)
<i>Variovorax</i>	10 (0,17%)
<i>Corynebacterium</i>	9 (0,16%)
<i>Gp1</i>	9 (0,16%)

<i>Gp5</i>	9 (0,16%)
<i>Massilia</i>	9 (0,16%)
<i>Nocardioides</i>	9 (0,16%)
<i>Dechloromonas</i>	8 (0,14%)
<i>Ferruginibacter</i>	8 (0,14%)
<i>Microbacterium</i>	8 (0,14%)
<i>Rhizomicrobium</i>	8 (0,14%)
<i>Stenotrophomonas</i>	8 (0,14%)
<i>Dongia</i>	7 (0,12%)
<i>Gp7</i>	7 (0,12%)
<i>Neisseria</i>	7 (0,12%)
<i>Pelomonas</i>	7 (0,12%)
<i>Lysobacter</i>	6 (0,10%)
<i>Mesorhizobium</i>	6 (0,10%)
<i>Planctomyces</i>	6 (0,10%)
<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	6 (0,10%)
<i>Veillonella</i>	6 (0,10%)
<i>Aeromicrobium</i>	5 (0,09%)
<i>Clostridium sensu stricto</i>	5 (0,09%)
<i>Flavobacterium</i>	5 (0,09%)
<i>Marmoricola</i>	5 (0,09%)
<i>Pseudonocardia</i>	5 (0,09%)
<i>Roseateles</i>	5 (0,09%)
<i>Sediminibacterium</i>	5 (0,09%)
<i>Acinetobacter</i>	4 (0,07%)
<i>Amycolatopsis</i>	4 (0,07%)
<i>Arthrobacter</i>	4 (0,07%)
<i>Chryseobacterium</i>	4 (0,07%)
<i>Dyadobacter</i>	4 (0,07%)
<i>Gemella</i>	4 (0,07%)
<i>Ralstonia</i>	4 (0,07%)
<i>Streptosporangium</i>	4 (0,07%)
<i>Terrimonas</i>	4 (0,07%)
<i>TM7_genera_incertae_sedis</i>	4 (0,07%)
<i>Anaerococcus</i>	3 (0,05%)
<i>Asticcacaulis</i>	3 (0,05%)
<i>Butyricoccus</i>	3 (0,05%)
<i>Conexibacter</i>	3 (0,05%)
<i>Gp17</i>	3 (0,05%)
<i>Kribbella</i>	3 (0,05%)
<i>Luteibacter</i>	3 (0,05%)
<i>Niastella</i>	3 (0,05%)

<i>Oscillibacter</i>	3 (0,05%)
<i>Petrobacter</i>	3 (0,05%)
<i>Polaromonas</i>	3 (0,05%)
<i>Shinella</i>	3 (0,05%)
<i>Skermanella</i>	3 (0,05%)
<i>Solirubrobacter</i>	3 (0,05%)
<i>Tumebacillus</i>	3 (0,05%)
<i>Agromyces</i>	2 (0,03%)
<i>Anaeromyxobacter</i>	2 (0,03%)
<i>Anaerosinus</i>	2 (0,03%)
<i>Aquicella</i>	2 (0,03%)
<i>Arcobacter</i>	2 (0,03%)
<i>Arenimonas</i>	2 (0,03%)
<i>Blastococcus</i>	2 (0,03%)
<i>Cellvibrio</i>	2 (0,03%)
<i>Cohnella</i>	2 (0,03%)
<i>Cupriavidus</i>	2 (0,03%)
<i>Ensifer</i>	2 (0,03%)
<i>Filimonas</i>	2 (0,03%)
<i>Finegoldia</i>	2 (0,03%)
<i>Gp10</i>	2 (0,03%)
<i>Gp2</i>	2 (0,03%)
<i>Gp22</i>	2 (0,03%)
<i>Haliangium</i>	2 (0,03%)
<i>Kaistia</i>	2 (0,03%)
<i>Lactobacillus</i>	2 (0,03%)
<i>Lactococcus</i>	2 (0,03%)
<i>Marinobacter</i>	2 (0,03%)
<i>Mycobacterium</i>	2 (0,03%)
<i>Nitrospira</i>	2 (0,03%)
<i>Novosphingobium</i>	2 (0,03%)
<i>Paludibacter</i>	2 (0,03%)
<i>Parabacteroides</i>	2 (0,03%)
<i>Pasteuria</i>	2 (0,03%)
<i>Peptoniphilus</i>	2 (0,03%)
<i>Planococcaceae_incertae_sedis</i>	2 (0,03%)
<i>Propionivibrio</i>	2 (0,03%)
<i>Proteus</i>	2 (0,03%)
<i>Rhodanobacter</i>	2 (0,03%)
<i>Rhodococcus</i>	2 (0,03%)
<i>Rhodopseudomonas</i>	2 (0,03%)
<i>Rothia</i>	2 (0,03%)

<i>Singulisphaera</i>	2 (0,03%)
<i>Steroidobacter</i>	2 (0,03%)
<i>Terrabacter</i>	2 (0,03%)
<i>Verrucomicrobium</i>	2 (0,03%)
<i>Aciditerrimonas</i>	1 (0,02%)
<i>Leuconostoc</i>	1(0,02%)
<i>Acidotherrmus</i>	1 (0,02%)
<i>Actinomycetospora</i>	1 (0,02%)
<i>Actinophytocola</i>	1 (0,02%)
<i>Afipia</i>	1 (0,02%)
<i>Albidiferax</i>	1 (0,02%)
<i>Amaricoccus</i>	1 (0,02%)
<i>Angustibacter</i>	1 (0,02%)
<i>Aquabacterium</i>	1 (0,02%)
<i>Bauldia</i>	1 (0,02%)
<i>Bdellovibrio</i>	1 (0,02%)
<i>Blastopirellula</i>	1 (0,02%)
<i>Brevibacillus</i>	1 (0,02%)
<i>Brevundimonas</i>	1 (0,02%)
<i>Chromohalobacter</i>	1 (0,02%)
<i>Cloacibacterium</i>	1 (0,02%)
<i>Cytophaga</i>	1 (0,02%)
<i>Dactylosporangium</i>	1 (0,02%)
<i>Dokdonella</i>	1 (0,02%)
<i>Dysgonomonas</i>	1 (0,02%)
<i>Fervidicoccus</i>	1 (0,02%)
<i>Friedmanniella</i>	1 (0,02%)
<i>Geobacter</i>	1 (0,02%)
<i>Granulicella</i>	1 (0,02%)
<i>Hyphomicrobium</i>	1 (0,02%)
<i>Ideonella</i>	1 (0,02%)
<i>Inquilinus</i>	1 (0,02%)
<i>Janthinobacterium</i>	1 (0,02%)
<i>Kocuria</i>	1 (0,02%)
<i>Ktedonobacter</i>	1 (0,02%)
<i>Micrococcus</i>	1 (0,02%)
<i>Microvirga</i>	1 (0,02%)
<i>Mitsuokella</i>	1 (0,02%)
<i>Modestobacter</i>	1 (0,02%)
<i>Moraxella</i>	1 (0,02%)
<i>Nannocystis</i>	1 (0,02%)
<i>Nevskia</i>	1 (0,02%)

<i>Nitrosospira</i>	1 (0,02%)
<i>Nocardia</i>	1 (0,02%)
<i>Nonomuraea</i>	1 (0,02%)
<i>Oxalicibacterium</i>	1 (0,02%)
<i>Phyllobacterium</i>	1 (0,02%)
<i>Porphyromonas</i>	1 (0,02%)
<i>Prevotella</i>	1 (0,02%)
<i>Prostheco bacter</i>	1 (0,02%)
<i>Pusillimonas</i>	1 (0,02%)
<i>Rubellimicrobium</i>	1 (0,02%)
<i>Sphaerobacter</i>	1 (0,02%)
<i>Spirosoma</i>	1 (0,02%)
<i>Tepidimonas</i>	1 (0,02%)
<i>Williamsia</i>	1 (0,02%)
<i>Xanthomonas</i>	1 (0,02%)

4.6.4. Diversidad de endofitos en las raíces de maíz

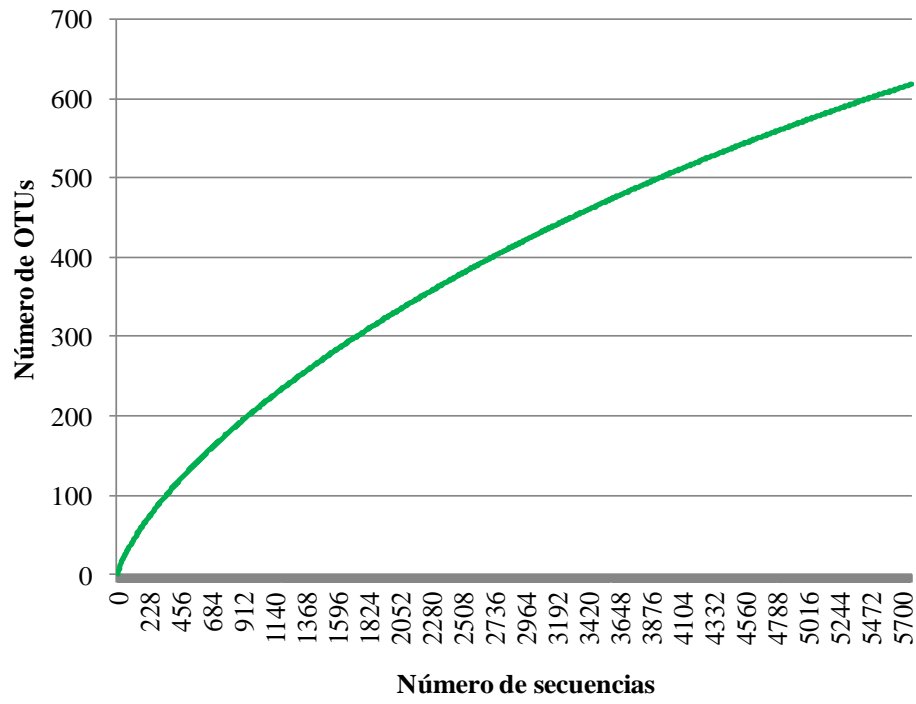
La diversidad alpha de las secuencias de la librería L-EMT se estimó calculando los índices de Shannon-Weaver (H'), Chao1, ACE, Simpson y Jackknife utilizando el software SPADE, que también permitió calcular el porcentaje de cobertura (Tabla 4.32). Los índices de rarefacción y de equidad se calcularon mediante RDP (Tabla 4.32). Entre los índices de diversidad alpha, Chao1 estimó la existencia de 1.012,6 OTUs y ACE de 1.164,6 OTUs. Los índices H' y Jackknife fueron de 3,24 y 3,22, respectivamente y de 0.26 el índice de Simpson. En la muestra analizada, el índice de cobertura fue de 94.4% y el de equidad fue de 0.51, lo que indica la ausencia general de dominancia por parte de un OTU.

Tabla 4.32. Número de secuencias (S), número de OTUs, índices de diversidad de Simpson, Equidad (E), Shannon-Weaver (H'), Jackknife, Chao1, ACE, valores de rarefacción y porcentaje de índice de cobertura (% IC) de l la librería L-EMT.

L-EMT									
S	OTUs	Rarefacción	ACE	Chao1	Simpson	H'	Jackknife	E	% Índice de Cobertura
5.779	618	617,94	1.164,6	1.012,60	0,26	3,24	3,33	0,51	94,40

El comando “Rarefaction” permitió la construcción de la curva de rarefacción correspondiente (Figura 4.16). Estos resultados, junto con los de los índices de cobertura, indican que la biodiversidad de las muestras está estadísticamente bien representada.

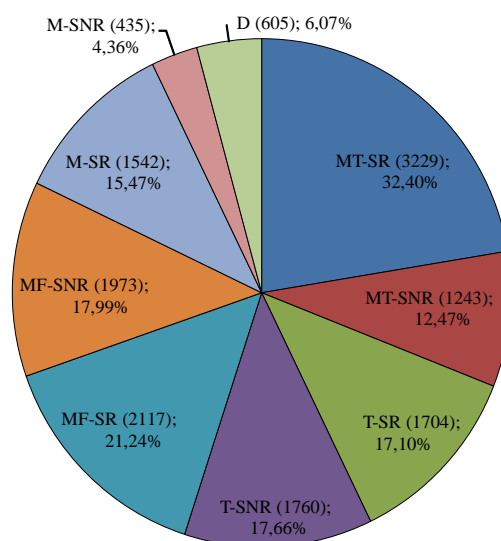
Figura 4.16. Curva de rarefacción de la muestra EMT de la librería L-EMT. Se utilizó el número de OTUs asignado en el “Clustering” del RDP al 97.0% de similitud.



4.7. Actividad PGPR general en suelos rizosféricos y no rizosféricos de las chacras maiceras

En este apartado se relacionan las bacterias que pueden actuar como PGPRs, y se clasifican de acuerdo a la posible función o actividad que pudieran realizar, concretamente aquellas implicadas en biocontrol, fijadoras de N₂, solubilizadoras de fosfato, productoras de hormonas vegetales, productoras de sideróforos, con actividad ACC-deaminasa e inductoras de resistencia sistémica. En la tabla 4.33 se presenta el número total de secuencias correspondientes a bacterias con actividad PGPR para cada una de las muestras de suelo rizosférico y no rizosférico en relación con el número total de secuencias (9.966). Respecto al suelo en descanso, a excepción de la muestra M-SNR, el número de secuencias aumentó significativamente, al menos 2 veces en la muestra MT-SNR y se quintuplicó en la muestra MT-SR. Una representación gráfica de los datos de la Tabla 4.33 se presenta en la figura 4.17.

Figura 4.17. Número (entre paréntesis) y porcentaje de secuencias con actividad PGPR en las muestras de suelo procedente de las chacras de Allpas.



En la categoría de bacterias relacionadas con biocontrol se incluyen sólo las implicadas en control de patógenos y enfermedades de plantas. En el caso de bacterias productoras de hormonas vegetales, se incluyen las que producen citoquininas, giberelinas y auxinas. Respecto a los microorganismos diazotrofos se consideran tanto los simbióticos como los fijadores en vida libre.

Mientras que las muestra M-SNR y las del suelo en descanso mostraron, en términos generales, un número similar, las restantes muestras tuvieron un mayor número de secuencias (Tabla 4.33).

4.7.1. Chacra cultivada con maíz asociado a trébol (MT-SR y MT-SNR)

En general, para cualquier actividad como bacteria PGPR, el número de secuencias en SR fue mayor que en SNR y, sin embargo, no se observaron variaciones significativas en el número de géneros (Tabla 4.33). En esta chacra, *Flavobacterium* y *Dechloromonas*, y posiblemente *Bacillus*, son los 3 géneros a los que se debe la mayor parte de la actividad PGPR (Tabla 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40 y 4.41).

4.7.2. Chacra cultivada con trébol

En la chacra cultivada con trébol andino, el número de secuencias correspondientes a bacterias fijadoras de nitrógeno fue mayor en el suelo no rizosférico. Para las otras actividades PGPR el número de secuencias en el suelo rizosférico superó a las del suelo no rizosférico (Tabla 4.33). Para ambos suelos, rizosférico y no rizosférico, no se observaron variaciones sustanciales respecto al número de géneros. En esta chacra, la mayor parte de la actividad PGPR se debe a los géneros *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Clostridium sensu stricto*, *Paenibacillus*, *Variovorax*, *Novosphingobium*, *Mucilaginibacter* y *Rhodanobacter* (Tablas 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40 y 4.41).

4.7.3. Chacra cultivada con maíz fertilizado

En esta chacra, como en la chacra cultivada con trébol, el número de secuencias correspondientes a los géneros fijadores de nitrógeno en el suelo rizosférico fue mayor que el detectado en el suelo no rizosférico. Para las restantes actividades PGPR, el número de secuencias determinadas en el suelo no rizosférico fue superior a las correspondientes del suelo rizosférico (Tabla 4.33). En todos los casos el número de géneros fueron similares. En esta chacra, la mayor parte de la actividad PGPR se debe a los géneros *Dechloromonas*, *Clostridium III* y *Geobacter* (Tablas 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40 y 4.41).

4.7.4. Chacra cultivada con maíz

En esta chacra se observa mayor actividad PGPR en el suelo rizosférico respecto al suelo no rizosférico (Tabla 4.33). El suelo rizosférico es 2 veces superior en el número de secuencias de bacterias implicadas en biocontrol, solubilizadoras de fosfatos, productoras de hormonas y de sideróforos, 3 veces mayor en actividad ACC-deaminasa y de inducción de resistencia sistémica, y 6 veces superior en el de bacterias fijadoras de nitrógeno (Tabla 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40 y 4.41). Como en las chacras anteriores, el número de géneros es similar en ambos suelos. La mayor actividad PGPR en esta chacra debe a los géneros *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Rhodoferax*, *Chryseobacterium*, *Clostridium III* y *Geobacter* (Tablas 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40 y 4.41).

Tabla 4.33. Número de secuencias (S) y de géneros bacterianos (N) con actividad PGPR. Bacterias implicadas en biocontrol (BC), fijadoras de nitrógeno (FN), solubilizadoras de fósforo (SP), productoras de fitohormonas (PH), productoras de sideróforos (PS), con actividad de ACC-deaminasa (ACC-D) e inductoras de resistencia sistémica (IRS)

Muestra	BC		FN		SP		PH		PS		ACC-D		IRS	
	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
MT-SR	1648	24	2886	29	1511	21	1666	24	1529	20	527	12	247	6
MT-SNR	796	22	1084	24	728	21	812	25	744	21	119	12	66	5
T-SR	1156	28	1289	30	1001	23	1417	29	1067	22	280	14	185	6
T-SNR	930	21	1573	26	791	21	934	24	790	18	229	12	76	5
MF-SR	509	24	2030	31	334	19	507	24	345	17	84	12	51	6
MF-SNR	758	25	1588	33	628	19	843	25	717	20	298	12	148	6
M-SR	565	26	1296	28	541	23	605	23	567	20	218	10	204	6
M-SNR	315	24	202	23	230	18	239	20	276	17	66	12	63	6
D	411	24	291	24	283	21	325	22	362	22	99	12	90	6

Tabla 4.34. Géneros bacterianos endófitos del maíz y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Flavobacterium</i>	1184	548	485	605	212	403	158	37	73
<i>Dechloromonas</i>	1161	75	37	340	1024	620	7	1	1
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Massilia</i>	52	45	41	68	42	136	2	17	8
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Sphingomonas</i>	26	59	78	7	23	9	46	55	60
<i>Variovorax</i>	20	14	45	9	12	91	19	16	15
<i>Bradyrhizobium</i>	16	15	49	43	25	25	40	32	22
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Hydrogenophaga</i>	4	0	2	2	14	30	36	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	3	2	16	3	0	0	0	6	1
<i>Methylobacterium</i>	3	0	4	3	0	3	0	1	3
<i>Pelomonas</i>	3	5	5	0	5	3	8	2	1
<i>Streptomyces</i>	2	2	5	2	2	5	21	36	54
<i>Arthrobacter</i>	2	2	15	8	6	10	6	6	9
<i>Herbaspirillum</i>	2	0	9	7	2	2	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Delftia</i>	2	0	0	2	0	0	6	0	0
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Microbacterium</i>	1	1	5	0	2	1	7	0	5
<i>Azonexus</i>	1	2	0	51	49	20	1	0	1
<i>Rhodobacter</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	0	3	1	0	2
<i>Curtobacterium</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Microbispora</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Ensifer</i>	0	0	18	0	0	0	0	1	1
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Azoarcus</i>	0	0	0	2	49	5	0	0	0
<i>Azohydromonas</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Ideonella</i>	0	0	0	0	1	1	0	7	0
<i>Acidobacterium</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Brevibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Total secuencias	2734	843	914	1240	1519	1512	544	245	295
Total géneros	23	19	22	21	21	23	20	19	23

Tabla 4.35. Géneros bacterianos implicadas en biocontrol y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Flavobacterium</i>	1184	548	485	605	212	403	158	37	73
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Clostridium III</i>	107	44	32	105	131	82	8	0	0
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Sphingomonas</i>	26	59	78	7	23	9	46	55	60
<i>Clostridium sensu stricto</i>	19	10	190	34	14	12	18	1	1
<i>Bradyrhizobium</i>	16	15	49	43	25	25	40	32	22
<i>Nocardioides</i>	10	17	16	8	12	15	10	30	44
<i>Pasteuria</i>	7	8	8	9	7	11	37	17	49
<i>Clostridium XIVa</i>	6	1	23	4	6	5	1	0	0
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Lysobacter</i>	5	10	5	2		6	8	42	47
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Stenotrophomonas</i>	3	2	16	3	0	0	0	6	1
<i>Methylobacterium</i>	3	0	4	3	0	3	0	1	3
<i>Streptomyces</i>	2	2	5	2	2	5	21	36	54
<i>Arthrobacter</i>	2	2	15	8	6	10	6	6	9
<i>Herbaspirillum</i>	2	0	9	7	2	2	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microlunatus</i>	2	2	1	0	1	1	7	4	2
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Rhodococcus</i>	1	1	5	2	2	10	0	3	0
<i>Paenibacillus</i>	1	0	86	0	2	2	1	2	2
<i>Exiguobacterium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	0	3	1	0	2
<i>Curtobacterium</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Microbispora</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Nocardia</i>	0	2	0	0	0	1	1	0	2
<i>Collimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Micromonospora</i>	0	0	0	0	0	0	2	10	1
<i>Actinomadura</i>	0	0	0	0	0	0	5	2	1
<i>Actinoplanes</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>Amycolatopsis</i>	0	0	0	0	0	0	7	3	0

<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>Methylobacter</i>	0	0	0	0	6	0	0	0	0
<i>Sphingobacterium</i>	0	0	5	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium IV</i>	0	0	21	0	4	8	0	0	0
<i>Clostridium XI</i>	0	1	2	1	2	0	0	1	0
<i>Desulfovibrio</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Total secuencias	1648	796	1156	930	509	758	565	315	411
Total géneros	24	22	28	21	24	25	26	24	24

Tabla 4.36. Géneros bacterianos fijadoras de nitrógeno y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas.

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Flavobacterium</i>	1184	548	485	605	212	403	158	37	73
<i>Dechloromonas</i>	1161	75	37	340	1024	620	7	1	1
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Clostridium III</i>	107	44	32	105	131	82	8	0	0
<i>Nitrospira</i>	40	75	35	51	39	46	23	51	79
<i>Geobacter</i>	37	87	13	65	342	136	27	3	0
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Clostridium sensu stricto</i>	19	10	190	34	14	12	18	1	1
<i>Bradyrhizobium</i>	16	15	49	43	25	25	40	32	22
<i>Magnetospirillum</i>	16	126	1	128	34	39	2	0	0
<i>Novosphingobium</i>	12	5	107	17	5	3	16		16
<i>Devosia</i>	10	5	41	15	7	6	11	14	21
<i>Clostridium XIVa</i>	6	1	23	4	6	5	1	0	0
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	5	4	7	2	2	3	3	5	10
<i>Nitrosospira</i>	5	2	7	0	0	1	1	1	3
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Methylobacterium</i>	3	0	4	3	0	3	0	1	3
<i>Pelomonas</i>	3	5	5	0	5	3	8	2	1
<i>Arthrobacter</i>	2	2	15	8	6	10	6	6	9
<i>Herbaspirillum</i>	2	0	9	7	2	2	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Delftia</i>	2	0	0	2	0	0	6	0	0
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Azonexus</i>	1	2	0	51	49	20	1	0	1
<i>Rhodobacter</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus</i>	1	0	86	0	2	2	1	2	2

<i>Mycobacterium</i>	1	5	3	2	2	3	4	10	7
<i>Rhodofera</i>	1	0	0	0	6	2	767	0	0
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Ensifer</i>	0	0	18	0	0	0	0	1	1
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Azoarcus</i>	0	0	0	2	49	5	0	0	0
<i>Azohydromonas</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Ideonella</i>	0	0	0	0	1	1	0	7	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Clostridium IV</i>	0	0	21	0	4	8	0	0	0
<i>Clostridium XI</i>	0	1	2	1	2	0	0	1	0
<i>Desulfovibrio</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Cupriavidus</i>	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>Azospira</i>	0	0	0	0	9	1	0	0	0
<i>Beijerinckia</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>Propionibacterium</i>	0	0	1	0	0	1	0	1	3
Total secuencias	2886	1084	1289	1573	2030	1588	1296	202	291
Total géneros	29	24	30	26	31	33	28	23	24

Tabla 4.37. Géneros bacterianos solubilizadoras de fosfatos y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Flavobacterium</i>	1.184	548	485	605	212	403	158	37	73
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Sphingomonas</i>	26	59	78	7	23	9	46	55	60
<i>Bradyrhizobium</i>	16	15	49	43	25	25	40	32	22
<i>Janthinobacterium</i>	8	2	26	11	1	0	12	0	0
<i>Rhodanobacter</i>	6	6	72	5	1	7	0	0	0
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	5	4	7	2	2	3	3	5	10
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Stenotrophomonas</i>	3	2	16	3	0	0	0	6	1
<i>Streptomyces</i>	2	2	5	2	2	5	21	36	54
<i>Arthrobacter</i>	2	2	15	8	6	10	6	6	9
<i>Herbaspirillum</i>	2	0	9	7	2	2	0	0	0
<i>Delftia</i>	2	0	0	2	0	0	6	0	0
<i>Labrys</i>	2	0	5	1	0	0	1	1	1
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2

<i>Rhodococcus</i>	1	1	5	2	2	10	0	3	0
<i>Paenibacillus</i>	1	0	86	0	2	2	1	2	2
<i>Chryseobacterium</i>	1	2	14	1	0	0	51	0	1
<i>Mycobacterium</i>	1	5	3	2	2	3	4	10	7
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	0	3	1	0	2
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Nocardia</i>	0	2	0	0	0	1	1	0	2
<i>Collimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Micromonospora</i>	0	0	0	0	0	0	2	10	1
<i>Dyella</i>	0	1	28	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i>	0	5	1	3	3	0	0	0	0
<i>Cupriavidus</i>	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>Thiobacillus</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Total secuencias	1511	728	1001	791	334	628	541	230	283
Total géneros	21	21	23	21	19	19	23	18	21

Tabla 4.38. Géneros bacterianos productoras de fitohormonas y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Flavobacterium</i>	1.184	548	485	605	212	403	158	37	73
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Clostridium III</i>	107	44	32	105	131	82	8	0	0
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Sphingomonas</i>	26	59	78	7	23	9	46	55	60
<i>Variovorax</i>	20	14	45	9	12	91	19	16	15
<i>Clostridium sensu stricto</i>	19	10	190	34	14	12	18	1	1
<i>Pedobacter</i>	17	22	197	6	5	23	33	2	23
<i>Bradyrhizobium</i>	16	15	49	43	25	25	40	32	22
<i>Clostridium XIVa</i>	6	1	23	4	6	5	1	0	0
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	5	4	7	2	2	3	3	5	10
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Stenotrophomonas</i>	3	2	16	3	0	0	0	6	1
<i>Methylobacterium</i>	3	0	4	3	0	3	0	1	3
<i>Streptomyces</i>	2	2	5	2	2	5	21	36	54

<i>Arthrobacter</i>	2	2	15	8	6	10	6	6	9
<i>Herbaspirillum</i>	2	0	9	7	2	2	0	0	0
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Microbacterium</i>	1	1	5	0	2	1	7	0	5
<i>Rhodococcus</i>	1	1	5	2	2	10	0	3	0
<i>Paenibacillus</i>	1	0	86	0	2	2	1	2	2
<i>Chryseobacterium</i>	1	2	14	1	0	0	51	0	1
<i>Mycobacterium</i>	1	5	3	2	2	3	4	10	7
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Nocardia</i>	0	2	0	0	0	1	1	0	2
<i>Dyella</i>	0	1	28	0	0	0	0	0	0
<i>Pandoraea</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Clostridium IV</i>	0	0	21	0	4	8	0	0	0
<i>Clostridium XI</i>	0	1	2	1	2	0	0	1	0
<i>Aeromonas</i>	0	5	1	3	3	0	0	0	0
<i>Aminobacter</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Methylovorus</i>	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Total secuencias	1.666	812	1.417	934	507	843	605	239	325
Total géneros	24	25	29	24	24	25	23	20	22

Tabla 4.39. Géneros bacterianos productoras de sideróforos y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Flavobacterium</i>	1.184	548	485	605	212	403	158	37	73
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Sphingomonas</i>	26	59	78	7	23	9	46	55	60
<i>Variovorax</i>	20	14	45	9	12	91	19	16	15
<i>Bradyrhizobium</i>	16	15	49	43	25	25	40	32	22
<i>Novosphingobium</i>	12	5	107	17	5	3	16		16
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Lysobacter</i>	5	10	5	2		6	8	42	47
<i>Mesorhizobium</i>	5	4	7	2	2	3	3	5	10
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Stenotrophomonas</i>	3	2	16	3	0	0	0	6	1
<i>Streptomyces</i>	2	2	5	2	2	5	21	36	54
<i>Arthrobacter</i>	2	2	15	8	6	10	6	6	9
<i>Chryseobacterium</i>	1	2	14	1	0	0	51	0	1

<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Microbacterium</i>	1	1	5	0	2	1	7	0	5
<i>Rhodococcus</i>	1	1	5	2	2	10	0	3	0
<i>Paenibacillus</i>	1	0	86	0	2	2	1	2	2
<i>Mycobacterium</i>	1	5	3	2	2	3	4	10	7
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Ensifer</i>	0	0	18	0	0	0	0	1	1
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Nocardia</i>	0	2	0	0	0	1	1	0	2
<i>Dyella</i>	0	1	28	0	0	0	0	0	0
<i>Pandoraea</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Total secuencias	1529	744	1067	790	345	717	567	276	362
Total géneros	20	21	22	18	17	20	20	17	22

Tabla 4.40. Géneros bacterianos con actividad ACC-Deaminasa y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

Género	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Acidovorax</i>	246	21	63	115	13	43	6	3	14
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Variovorax</i>	20	14	45	9	12	91	19	16	15
<i>Azospirillum</i>	5	7	0	13	3	3	3	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	5	4	7	2	2	3	3	5	10
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Methylobacterium</i>	3	0	4	3	0	3	0	1	3
<i>Caulobacter</i>	2	2	11	9	2	0	0	2	13
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Rhodococcus</i>	1	1	5	2	2	10	0	3	0
<i>Mycobacterium</i>	1	5	3	2	2	3	4	10	7
<i>Pantoea</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Phyllobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Ensifer</i>	0	0	18	0	0	0	0	1	1
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Dyella</i>	0	1	28	0	0	0	0	0	0
<i>Pandoraea</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Total secuencias	527	119	280	229	84	298	218	66	99
Total géneros	12	12	14	12	12	12	10	12	12

Tabla 4.41. Géneros bacterianos inductoras de resistencia sistémica y su número de secuencias en las muestras de suelo de las chacras de Allpas

<i>Género</i>	MT-SR	MT-SNR	T-SR	T-SNR	MF-SR	MF-SNR	M-SR	M-SNR	D
<i>Bacillus</i>	209	12	56	64	15	131	80	19	17
<i>Pseudomonas</i>	30	46	13	6	26	4	35	3	2
<i>Rhizobium</i>	4	3	18	2	4	4	66	2	13
<i>Streptomyces</i>	2	2	5	2	2	5	21	36	54
<i>Burkholderia</i>	1	3	7	2	2	2	1	1	2
<i>Paenibacillus</i>	1	0	86	0	2	2	1	2	2
Total secuencias	247	66	185	76	51	148	204	63	90
Total géneros	12	12	14	12	12	12	10	12	12

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de bacterias endosimbióticas aisladas de nódulos de plantas de *M. hispida* G. (trébol andino) crecidas, como cultivo espontáneo de cobertura, en un suelo procedente de una chacra maicera de la comunidad indígena de Allpas-Acobamba-Huancavelica (Perú). La fertilidad de estas chacras se mantiene desde hace más de 5.000 años y la asociación simbiótica entre el trébol andino y los rizobios nativos es el principal sistema de aporte de N al suelo de las chacras.

A partir de los extractos de nódulos se obtuvieron 54 cepas que representaron las diferentes morfologías de las unidades formadoras de colonias que aparecieron en las placas de cultivo. Puesto que las bacterias que presentan el mismo perfil REP-PCR pertenecen a la misma especie (de Bruijn, 1992, Versalovic et al. 1998, Ishii y Sadowsky 2009), el empleo de esta técnica de huella genética como herramienta molecular permitió agrupar las cepas bacterianas que se aislaron de los nódulos en 31 grupos REP (Tabla 4.3). Posteriormente, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA de una cepa representativa de cada grupo REP demostró la presencia de 3 especies, *E. medicae*, *R. giardinii* y *K. granuli*, incluidas en el orden Rhizobiales de las Alphaproteobacteria, que constituyeron el 25% de las cepas aisladas (Tabla 4.3; Figura 4.2).

Las especies de rizobios capaces de formar asociaciones simbióticas con plantas del género *Medicago* pertenecen a dos especies estrechamente relacionadas del género *Ensifer*, *E. meliloti* (Jordan 1984) y *E. medicae* (Rome et al. 1996a). Ambas especies de *Ensifer* tienen propiedades bioquímicas similares, aunque pueden distinguirse por sus diferentes características fenotípicas y genotípicas (Brunel et al. 1996; Rome et al. 1996b). La cepa tipo *E. medicae* A321^T se aisló de nódulos de *M. truncatula* y, a nivel genético, se diferencia de la especie tipo de *E. meliloti* LMG-6133^T en 4 nucleótidos y una delección (Rome et al. 1996a).

Aunque ambas especies de *Ensifer* son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con *M. sativa*, *M. truncatula*, *M. minima* y *M. orbicularis*, la presencia de *E. meliloti* en los nódulos de tales plantas es más frecuente que la de *E. medicae* (Brunel et al. 1996; Zribi et al. 2004). También se ha descrito que *M. polymorpha* (sinónimo de *M. hispida*) forma simbiosis efectivas con *E. medicae* y no con *E. meliloti* (Rome et al. 1996b). Aún más, en experimentos de invernadero se ha comprobado que *E. medicae* indujo la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en *M. murex*, mientras que *E. meliloti* no fue infectivo en esa especie (Garau et al. 2005). A partir de un estudio (Garau et al. 2005) en el que se llevó a cabo el aislamiento de 39 cepas de nódulos de 11 especies diferentes de *Medicago* se ha concluido que la presencia de *S. medicae* es predominante en los nódulos de especies adaptadas a suelos moderadamente ácidos, tales como *M. arabica*, *M. murex* y *M. polymorpha*, mientras que *E. meliloti* se

obtiene con mayor frecuencia de los nódulos de especies que crecen en suelos de pH moderadamente alcalinos y neutros, entre ellos *M. littoralis* y *M. tornata*. Por otra parte, se ha sugerido la existencia de una relación preferencial entre *E. meliloti* y las *Medicago* tetraploides, como *M. sativa*, y entre *E. medicae* y las especies diploides, que son la mayoría de las especies anuales (Biondi et al. 2003). Además de en el hemisferio norte, *S. meliloti* y *S. medicae* se han aislado de nódulos de *M. sativa*, *M. lupulina* y *M. polymorpha* de tres localidades de México (Silva et al. 2007). Basándose en el análisis de los perfiles de bajo peso molecular del ARN de 179 cepas aisladas de *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*, del Villar et al. (2008) han comprobado que los perfiles I y II, identificados como pertenecientes a *E. meliloti*, fueron predominantes en *M. alba*, *M. officinalis* y *M. sativa*, mientras que los perfiles III y IV, identificados como *E. medicae*, fueron predominantes en *M. parviflora*, *M. sphaerocarpa*, *M. lupulina* y *T. foenum-graecum*. Recientemente, se ha localizado un oligonucleótido de 1468 pares de bases (número de identificación GU143691) en el megaplásmido pSED001 de *S. medicae* WSM419 que permite la identificación de *E. medicae* y su distinción de otras bacterias del suelo (Dourado et al. 2009). Si se considera que *M. hispida* es una *medicago* anual y que el pH del suelo de la chacra maicera es de 6.34 (Tabla 4.1), parece lógico que *E. medicae* sea la especie de rizobio más abundante en los nódulos del trébol andino.

La presencia de *R. giardinii* en nódulos de *Medicago* no se ha descrito hasta la fecha. En este trabajo se ha aislado la cepa AP12 que tiene un 99% de similitud con la cepa tipo *R. giardinii* H152^T (Figura 4.3, Tabla 4.5). Esta especie se obtuvo por primera vez de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, de la que se han descrito dos biovariedades, *R. giardinii* bv. *giardinii* que nodula *Phaseolus* spp., *Leucaena leucocephala* y *Macroptilium atropurpureum*, pero es incapaz de fijar nitrógeno en simbiosis con *P. vulgaris*, y *R. giardinii* bv. *phaseoli* que nodula *Phaseolus* spp y *M. atropurpureum*, no forma nódulos con *L. leucocephala* y es capaz de fijar N₂ con *P. vulgaris* (Amarger et al. 1997). *R. giardinii* se ha aislado también de nódulos de *K. stipulaceae* y *Aeschynomene indica* (Kwon et al. 2005), *Arachis hypogea* L. crecidas en diversos suelos de Córdoba (Argentina) (Taurian et al. 2006) y *Desmanthus illinoensis* cultivadas en 20 suelos diferentes de las praderas del Medio Oeste de los Estados Unidos de América (Beyhaut et al. 2006).

La secuencia del gen 16S rRNA de la cepa AP2, aislada a partir de los nódulos de *M. hispida*, presenta un 99.04% de similitud con la cepa tipo Ko04^T de *K. granuli* (Figura 4.3, Tabla 4.6). Hasta la fecha se han aislado y caracterizado 4 especies del género *Kaistia*, todas ellas en Corea del Sur. *K. adipata* se identificó a partir de una muestra de suelo (Im et al.

2004), *K. soli* de turba (Weon et al. 2008), *K. granuli* de un reactor de lodos anaeróbicos (Lee et al. 2007) y *K. terrae* de los humedales de Yongneup (Kim et al. 2010). Aunque el género *Kaistia* consta como miembro del orden Rhizobiales en el apartado de taxonomía del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=166953>), no existen evidencias sobre el aislamiento de especies de este género a partir de nódulos de leguminosas, ni de su capacidad para fijar N₂ en vida libre. Actualmente se llevan a cabo experimentos de infección de *M. hispida* y *M. sativa* para establecer con claridad la capacidad de la cepa AP2 para nodular y fijar nitrógeno en simbiosis con tales plantas.

El orden Rhizobiales se caracteriza por formar nódulos fijadores de nitrógeno con sus plantas hospedadoras específicas. Sin embargo, la descripción de bacterias que no son miembros del orden Rhizobiales, y de las que no se ha descrito su capacidad para nodular, pero que se encuentran en el interior de los nódulos de leguminosas, es cada vez, más frecuente (Kan et al. 2007; Balachandar et al. 2007; Muresu et al. 2008; Stajković et al. 2009). En este estudio, de los nódulos de trébol andino, además de las especies de rizobios capaces de nodular, se identificaron otras especies de los géneros *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Duganella*, *Sphingopyxis* y *Microbacterium*, que representaron, en conjunto, el 75% del total de las cepas aisladas (Tabla 4.3, Figura 4.2).

Stenotrophomonas se ha aislado de los nódulos de *Vicia angustifolia* (Kan et al. 2007) y de *Astragalus sinicus* (Zhang et al. 2010). Como habitante de la rizosfera, su interés radica en su potencial como promotor del crecimiento y en su intervención como elemento de control biológico de enfermedades de plantas (Dunne et al. 1998; Nakayama et al. 1999; Arite et al. 2002; Müller et al. 2008; Hayward et al. 2009).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bien conocidas por su capacidad para actuar como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs, plant growth promoting rhizobacteria). Esta capacidad se debe a la producción de fitohormonas, movilización de nutrientes del suelo, otorgar resistencia a la planta frente a las enfermedades, etc. (Morgan et al. 2005; Lugtenberg y Kamilova 2009). Distintas especies de *Pseudomonas* se han detectado en el interior de los nódulos de *Hedysarum spinosissimum* subsp. *capitatum* y *H. carnosum* (Benhizia et al. 2004; Muresu et al. 2008), *M. truncatula* (Zakhia et al. 2006) y de *Ornithopus compressus* (Muresu et al. 2008). Se ha observado también que la coinoculación de *P. putida* con *Bradyrhizobium* en *Vigna radiata* incrementa la elongación radicular, biomasa total, número de nódulos, peso fresco y seco de nódulos, comparadas con las plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* (Shaharoon et al. 2006).

No se han encontrado datos en la bibliografía que indiquen la existencia de *Duganella* en nódulos de leguminosas. *D. violaceinigra* se ha aislado de suelos forestales de China (Li et al. 2004), de suelos contaminados con Cl₂Hg (Mera y Iwasaki 2007), de los exudados de las raíces de plantas transgénicas de *Lotus* (Oger et al. 2004), así como de muestras de suelo, agua, hielo y macroalgas en la Península Antártica (Asencio 2009). Este mismo autor ha demostrado la capacidad de *Duganella* para producir compuestos con actividad antimicrobiana.

Igualmente, no se han descrito especies del género *Rheinheimera* en el interior de nódulos de plantas leguminosas. Esta bacteria se ha aislado de la rizosfera de plantas no leguminosas como *Calystegia soldanella* y *Elymus mollis* crecidas en las dunas de arena de Tae-An (Corea del Sur) (Park 2005), y de las raíces de *Oryza sativa* (Zhang et al. 2008).

Choi et al. (2010) aislaron *Sphingopyxis soli* de un suelo de vertedero y demostraron que produce espermidina, un precursor de las poliaminas que actúan como fitohormonas y afectan al desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta a estrés de las plantas. La búsqueda bibliográfica realizada durante este trabajo no ha resultado en datos que indiquen la presencia de *Sphingopyxis* en nódulos de leguminosas.

Achromobacter se ha detectado en suelos tratados con carbofuran, y se ha comprobado su capacidad para hidrolizar otros carbamatos (Karns et al. 1986). Igualmente, degrada aldicarb, un potente nematocida (Read 1987). En el futuro se podría plantear nuevos trabajos para evaluar en biorremediación en ambientes contaminados con pesticidas.

La presencia de *Microbacterium* spp. se ha observado en las raíces de las orquídeas, y, en vida libre, produce ácido indol acético (Tsavkelova et al. 2005). También coloniza la rizosfera de *C. soldanella* y *E. mollis* (Park 2005). En relación con las leguminosas, *Microbacterium* se ha aislado de nódulos *Retama raetam* y *Ononis natrix* crecidas de manera espontánea en zonas áridas de Tunez (Zakhia et al. 2006), de *Ornithopus pinnatus*, una leguminosa silvestre típica de Sardinia (Italia) (Muresu et al. 2008) y de *Medicago sativa* (Stajković et al. 2009).

Xanthomonas maltophilia, como PGPR es una excelente solubilizadora de fosfato (De Freitas et al. 1997). Igualmente, se ha aislado de nódulos de la leguminosa silvestre *H. spinosissimum* (Muresu et al. 2008).

Aunque los endofitos no incluidos en el orden Rhizobiales descritos en este trabajo tienen el potencial de favorecer el desarrollo de las plantas mediante la producción de ácido indol acético, la solubilización de fosfato, la capacidad de fijar nitrógeno, de producir compuestos antimicrobianos, etc., se desconoce si estas capacidades ocurren en el nicho ecológico que representa el interior de los nódulos de las leguminosas. Si así fuera, es posible que la

diversidad biológica encontrada en los nódulos de *M hispida* constituya un excelente consorcio microbiano con el objetivo de favorecer la nutrición, crecimiento y desarrollo del trébol andino. Esta planta se constituye, por tanto, en excelente candidato para contribuir a la recuperación y fertilidad tanto de las chacras maiceras de Allpas-Acobamba-Huancavelica (Perú), como de otras chacras a lo largo y ancho de los Andes peruanos.

El trébol andino, una leguminosa anual, se encuentra ampliamente distribuida en las chacras maiceras de la región quechua del Perú y crece asociada innatamente a los cultivos de maíz cebada, trigo, habas, etc., su adaptación a este piso ecológico posiblemente se deba a la propia plasticidad de la planta, cuyas características se ajusta bien a la diversidad de climas y suelos presentes en esta región, y permite a las chacras de las familias campesinas producir cosechas sostenibles de maíz amiláceo en condiciones de monocultivo sin utilizar fertilización química y pesticidas (Anderson et al. 1997; Grobman et al. 1961). Asimismo, la cultura del pastoreo en estas comunidades campesinas principalmente con ganado vacuno, equino y ovino para aprovechar el forraje producido por el trébol y otras plantas, además de reciclar la biomasa, favorece interrumpir el ciclo de plagas y enfermedades (World Resources Institute 2007).

M. hispida presenta una serie de características propias entre ellos tenemos la presencia de un porcentaje elevado de semillas "duras", impermeables al agua, capaces de permanecer en el suelo durante la fase de crecimiento del cereal, y germinar al año siguiente del cultivo (Del Pozo et al., 1989; Moynihan et al. 1996), produce entre 0.6 a 1.5 t ha⁻¹ de semillas (Puckridge and French 1983; Lelievre y Porqueddu 1994; Cocks 1997; Loi et al. 1995), presenta latencia de semillas, esta particularidad es esencial para la supervivencia de esta leguminosa en las zonas secas tipificadas por un patrón de lluvias impredecibles (Villiers 1972), su porcentaje de semillas blandas sobre la superficie del suelo al primer año es de de 3,2% (media de 4 años) y llega al 83% al quinto año (Avendaño et al. 1993), lo que le permite evitar la germinación de las plántulas y la mortalidad como consecuencia de lluvias fuera de temporada (Puckridge y French 1983), producen abundante semilla (20.000 semillas por m² y 1000 semillas pesa 3,4 g) (Walsh et al. 2001), presenta baja sensibilidad al fotoperíodo y a la vernalización (Clarkson y Russel 1975; Aitken 1985), su fenología de floración es muy variable (Ehrman y Pollas 1996), varía entre 71 a 183 días después de emergencia de plantas (Crawford et al. 1989; Graziano et al. 2010), posee una capacidad de sobrevivir a períodos desfavorables en diversas zonas bioclimáticas (Bounjemate et al. 1992) como la altitud y la precipitación (Ehrman y Cocks 1990; Piano et al. 1991), se adapta bien a suelos ácidos (Gillespie 1987; Cunningham y Munns 1984; Munns y Keyser 1981), suelos ligeramente

alcalinos en zonas de baja y mediana precipitación (250-600 mm), así como a suelos arcillosos y franco-arenosos (Loi et al. 1995; Garau et al. 2005) y suelos de mal drenaje (Francis y Poole 1973). Es una leguminosa forrajera invernal de alta calidad (Lesins y Lesins 1979; Zhu et al. 1996; Shrestha et al. 1998; Issolah et al. 2011), adecuada para el pastoreo, sistema que se utiliza ampliamente en las regiones de tierras agrícolas secas del mundo (Walsh et al. 2001), producen entre 2 y 10 t de materia seca/ha (Loi et al. 1995; Zhu et al. 1998) con un contenido medio de 2,24% a 3,13% de nitrógeno (Zhu et al. 1998; Graziano et al. 2010). Como cultivo de cobertura reduce la erosión del suelo (Fisk et al. 2001; De Haan et al. 1997), incrementa la materia orgánica y el contenido de N, los que serán utilizados para los cultivos posteriores (Zhu et al. de 1998; Sheaffer et al. 2001), incrementa el rendimiento del maíz en 25,3% (Jeranyama et al. 1998), aunque también es considerada en otros ambientes como maleza (Vibrans 1999; Muhammad et al. 2009) y es susceptible al control mediante la solarización del suelo (Elmore 1991). La capacidad de esta especie para establecer simbiosis fijadora de nitrógeno atmosférico le convierte en un excelente candidato para su uso en sistemas agrícolas sostenibles porque aporta entre 298 a 313 kg N/ha/año en una chacra maicera (Howieson et al. 2000).

Los restos de cosecha y los estiércoles depositados en las chacras maiceras son fuente de carbono para los diversos géneros bacterianos del suelo, quienes mediante la liberación de diversas enzimas permiten su biodegradación, esta actividad es vital para el flujo de nutrientes a través del suelo y el ciclo de C, N, P y S, así como para la productividad de estas chacras. Los géneros determinados en las diferentes chacras producen diversas enzimas para utilizar el substrato orgánico, entre ellos *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces* poseen la capacidad de liberar celulasa que transforma la celulosa en subunidades de glucosa; mientras *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, son géneros fuertemente proteolíticas, utilizan la proteasa para transformar la proteína en amino ácidos; en cambio *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Chromobacterium*, transforman el almidón en glucosa mediante la amilasa y glucosidasa; *Arthrobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* utilizan la ligninasa para convertir la lignina en subunidades aromáticas; mientras *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* son productoras de pectinasa que transforma la pectina en subunidades de ácido galacturónico; igualmente, *Acinetobacter* y *Bacillus*, utilizan la invertasa para convertir la sucrosa en fructuosa y ésta en glucosa; en cambio *Streptomyces* y *Nocardia* producen quitinasa que transforma la quitina en subunidades de amino azúcar (Killham 1994; Killham y Prosser 2007), de esta manera los restos de cosecha incorporadas al suelo son mineralizadas y contribuyen a restituir la fertilidad natural del suelo. Los géneros bacterianos citados en este

proceso de biomineralización de la materia orgánica fueron determinadas en cada una de las muestras de los suelos de Allpas, con excepción de *Chromobacterium* y *Acinetobacter* que fueron encontradas sólo en algunas muestras, (Tabla 4.16).

La diversidad bacteriana en las chacras maiceras evaluadas utilizando el ADN procedente de las diferentes muestras de suelo, muestran que en la capa arable de estas chacras maiceras el phylum Proteobacteria es el mayor representante (24,36% - 51,18%), seguido por Bacteroidetes (12,16% - 31,41%), Acidobacteria (6,63% - 25,26%), valores similares fueron citadas por Acosta-Martinez et al (2010), al evaluar la comunidad microbiana de la capa arable del suelo conducidas bajo diferentes practicas de labranza y de rotación de cultivos, quienes además sugieren que las diferencias en las comunidades microbianas son principalmente afectados por la rotación de cultivos que por las prácticas de arado. Los mismos autores indican que mediante la pirosecuenciación fue posible detectar que las prácticas de arado pueden afectar la distribución de phyla. Igualmente Roesch et al. (2007) al evaluar el ADN procedente de 4 suelos (una de foresta y 3 suelos agrícolas) de diferentes regiones utilizando pirosecuenciación GS FLX, determinaron que del mayor del 40% de secuencias correspondieron al phylum Proteobacteria, seguido de bacteroidetes con un 15% - 25%.

En las muestras de SR y SNR de estas chacras maiceras, el dominio Archaea están representado por 0,24% - 2,25%, estos valores son inferiores a los determinados por Roesch et al. (2007) quienes encontraron valores de 4,6% - 12,5%, y de Cao et al. (2011) quienes determinaron entre 0.20% - 9.26%, su elevada presencia de Archaea en los suelos se atribuye al contenido de humedad, nitrógeno disponible, arcilla del suelo, materia orgánica, pH, etc. (Cao et al. 2011). Estos parámetros en las muestras de suelo de las chacras maiceras fueron similares (Tabla xx-análisis de suelos), se sospecha que la calidad de la materia orgánica podría influir en el mayor porcentaje de Archaea en D (chacra en descanso) y MT-SNR (chacra con maíz, pero que ha estado en descanso), porque durante el periodo de descanso las chacras presentan abundante producción de gramíneas y otras herbáceas especialmente en la época lluviosa, los que podrían influir en la calidad de la materia orgánica en comparación a las demás muestras suelo. Al respecto Shen et al. (2011) determinaron que el número de secuencias de Archaea y bacteria no tienen correlación significativa con el pH del suelo, pero si existe una correlación con la materia orgánica del suelo.

Los índices de diversidad de Chao1 y Ace evaluadas al 97% de similitud basados en el número de OTUs, indican una elevada diversidad bacteriana en las diferentes muestras de

suelo de las chacras de Allpas, valores inferiores a los obtenidos fueron determinados por Acosta-Martínez et al. (2008), Acosta-Martínez et al. (2010) y Roesch et al. (2007), y son similares a los obtenidos Chaudhry et al. (2012).

Los microorganismos asociados a la rizosfera poseen diversas capacidades metabólicas y desempeñan un papel decisivo en la salud de las plantas, dentro de ellos tenemos a los géneros implicados en la fijación biológica del nitrógeno mediante simbiosis o en vida libre presentes en el suelo no rizosférico, rizosférico, rizoplano y como endófito (Saharan y Nehra 2011), esta actividad tiene un valor agronómico, ecológico y ambiental inestimable, porque es la forma y la fuente más barata de suministrar nitrógeno a la chacra y contribuir en la reposición de la fertilidad natural del suelo, especialmente en aquellas chacras campesinas donde el suelo permanece en descanso por largos periodos (4 a más años), o en las chacras con siembras anuales como las sara chacras andinas. En las muestras de los suelos procedentes de las chacras de Allpas se han determinado diversos géneros bacterianos implicados en la fijación del nitrógeno atmosférico entre ellos tenemos *Azonexus*, *Azoarcus*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Pelomonas* y *Rhodobacter* (Wurdig et al. 2007), *Flavobacteria* (Bally et al. 1983), *Geobacter* (Ueki y Lovley 2010), *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* y *Ensifer* (Sahgal y Johri 2003), *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum* (Saxena y Tilak 1998), *Devosia* (Rivas et al. 2002), *Cupriavidus* (Chen et al. 2003), *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Sphingomonas* (Baldani et al., 1986; Vargas et al., 2003), *Paenibacillus* (Timmusk et al. 2005), *Arcobacter*, *Delftia*, *Desulfosporosinus*, *Desulfovibrio*, *Methylobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Sphingomonas*, *Thiobacillus* y *Zoogloea* (Wurdig et al. 2010).

La capacidad de producir fitohormonas tales como auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquinas por los géneros bacterianos en la rizosfera de los cultivos, tiene un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo al contribuir en la fisiología de las plantas (Selvaraj et al. 2008; Ahmad et al. 2008). En las chacras maiceras se han determinado diferentes géneros bacterianos reportados como productoras de fitohormonas, tales como *Acinetobacter* (Indiragandhi et al. 2008), *Azospirillum*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* (Thakuria et al. 2004), *Bradyrhizobium* (Wani et al. 2008), *Dyella*, *Burkholderia* y *Pandoraea* (Anandham et al. 2008), *Mesorhizobium* (Chandra et al. 2007), *Methylobacterium* (Senthilkumar et al. 2009), *Paenibacillus* y *Bacillus* (Beneduzi et al. 2008), *Pantoea* (Selvakumar et al. 2008), *Pseudomonas* y *Mycobacterium* (Dell'Amico et al. 2008), *Rhizobium* (Sridevi et al. 2008), *Variovorax*, *Rhodococcus* y *Flavobacterium* (Belimov et al.

2005), *Xanthomonas* (Sheng y Xia 2006), *Sphingomonas* (Tsavkelova et al. 2005), *Aeromonas* (Vessey 2003) y *Stenotrophomonas* (Berg et al. 2010).

La presencia de bacterias implicadas en la solubilización de fosfatos en la rizosfera del maíz y del trébol andino son importantes, porque incrementa la biodisponibilidad del fósforo en el suelo y mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yu et al. 2011). En las muestras de suelo de las chacras de Allpas, se han determinado los géneros *Burkholderia* (Song et al. 2008), *Pseudomonas* (Trivedi and Sa 2008), *Burkholderia* y *Pantoea* (Elizabeth et al. 2007), *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Phyllobacterium* (Chen et al. 2006), *Paenibacillus*, (Vazquez et al. 2000), *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* (Yu et al. 2010), *Flavobacterium* y *Aeromonas* (Rodríguez y Fraga 1999), *Xanthomonas* (de Freitas et al. 1997), *Rhizobium* (Alikhani et al. 2007), *Bradyrhizobium* (Deshwal et al. (2003), *Mesorhizobium* (Ahmad et al. 2008) y *Azospirillum* (Yasmin et al. (2004).

Los diferentes microorganismos implicados como PGPR han desarrollado diversos mecanismos para superar la baja biodisponibilidad de hierro, que implica la síntesis y secreción de quelantes de hierro de bajo peso molecular conocidas como "sideróforos", que son portadores de hierro con una afinidad muy alta (Ramos-Solano et al. 2010), en las muestras de suelo de Allpas, se han determinado géneros bacterianos reportados como productoras de sideróforos tales como *Bacillus* (Raza et al. 2008), *Pseudomonas* (Ambrosi et al. 2000), *Burkholderia* (Agnoli et al. 2006) *Paracoccus* (Chincholkar 2000), *Kluyvera* (Burd et al. (2000), *Mesorhizobium* (Chandra et al. (2007), *Pseudomonas* y *Mycobacterium* (Dell'Amico et al. 2008), *Streptomyces* (Dimkpa et al. 2008), *Dyella* y *Pandoraea* (Anandham et al. 2008), *Acinetobacter* (Indiragandhi et al. 2008), *Pantoea* (Selvakumar et al. 2008), *Variovorax*, *Rhodococcus* y *Flavobacterium* (Belimov et al. 2005), *Bradyrhizobium* (Wani et al. (2008), *Rhizobium* (Sridevi et al. (2008) y *Stenotrophomonas* (Berg et al. 2010).

Durante la conducción del cultivo maíz y otros cultivos en las chacras maiceras los campesinos no utilizan pesticidas para realizar control de plagas y enfermedades, está demás decir que muchos no conocen. En estas chacras las bacterias del suelo con actividad PGPR serían las responsables de sintetizan moléculas antifúngicas y antibióticos que permiten contrarrestar el daño del patógeno hacia la planta (Jin et al. 2011; Pliego et al. 2011). En las muestras de suelo analizadas se han determinado diferentes géneros bacterianos implicados en biocontrol, entre ellos tenemos a *Pseudomonas* (Siddiqui et al. 2001), *Streptomyces* (Zhang et al. 2003), *Paenibacillus* (Ryu et al. 2006), *Mesorhizobium* (Chandra et al. 2007), *Azospirillum* (Russo et al. 2008), *Flavobacterium* (Litterick et al. 2004), *Cellomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Xanthomonas* (Weller 1988), *Burkholderia*, *Comamonas* y *Sphingomonas*

(Kyselkova' et al. 2009), *Arthrobacter*, *Actinoplanes* (Whipps 2001), *Curtobacterium* (Raupach y Kloepper, 1998), *Lysobacter* (Li et al. 2008), *Collimonas* (Kamilova et al. 2007), *Amycolatopsis*, *Methylobacterium*, *Pantoea* y *Phyllobacterium* (Chen et al. 1995) *Microbispora* y *Nocardioides* (Coombs et al. 2004), *Delftia*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Kocuria* (Insunza et al. 2002; Jin et al. 2011), *Rhodococcus* (Barbey et al. 2012), *Pasteuria*, *Clostridium* y *Desulfobribrio* (Jatala 1986; Akhtar y Malik 2000), *Lactobacillus* (Gaikwad et al 2011)

La mayor parte de las siembras de maíz y otros cultivos en las chacras campesinas se realiza en condiciones de secano expuesto a la variabilidad del clima, principalmente a la variabilidad de la presencia de lluvias y cambios de temperatura, los que generan stress en el cultivo, cuya respuesta fisiológica es la producción principalmente de la fitohormona etileno, esta fitohormona es desdoblada por las bacterias PGPRs del suelo que poseen la enzima Amino Ciclo propano Carboxílico deaminasa (ACC-D), de este modo en estas chacras facilita el crecimiento y desarrollo de las plantas al decrecer los niveles de etileno dentro de la planta (Glick et al. 2007; Dodd et al. 2009). En las chacras maiceras se han determinado géneros reportados con actividad ACC-D como *Acidovorax* y *Rhodococcus* (Belimov et al. 2001, 2005), *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. (Indiragandhi et al. 2008), *Azospirillum* (Blaha et al. 2006), *Bacillus* (Ghosh et al. 2003), *Caulobacter* (Nierman et al. 2001), *Dyella*, *Burkholderia*, *Pandoraea* (Anandham et al. 2008), *Ensifer* (Belimov et al. 2005), *Mesorhizobium* (Sullivan et al. (2002), *Methylobacterium* (Madhaiyan et al. 2007), *Mycobacterium* y *Pseudomonas* (Dell'Amico et al. 2008), *Phyllobacterium* (Contesto et al. 2008), *Rhizobium* (Ma et al. 2003) y *Variovorax* (Belimov et al. 2009).

En las siembras de los diversos cultivos (maíz, papa, habas, etc) en las chacras campesinas se han observado hojas de plantas perforadas principalmente por la alimentación de artrópodos, estas heridas antes de continuar necrosando o ser puerta de entrada para las invasiones posteriores por patógenos se cicatrizan y el cultivo continúa su ciclo productivo; otras veces el inicio de ataque por un patógeno queda en su fase de inicio, esta cualidad de tolerancia o de "inmunidad" conferida a la planta serían otorgadas por las bacterias PGPR que poseen la actividad conocida como inducción de resistencia sistémica (IRS) (Bent 2006; Van Oosten et al. 2008). En las muestras de suelo se han determinado los generos *Rhizobium* (Reitz et al. 2002), *Pseudomonas*, *Bacillus* (Bakker et al. 2007), *Burkholderia* (Coventry and Dubery 2001), *Paenibacillus* (Timmusk and Wagner 1999) y *Streptomyces* (Conn et al. 2008), que previamente han sido descritos como IRS.

Empleando pirosecuenciación fue posible detectar la presencia y su biodiversidad de los géneros bacterianos endofitos establecidos en los tejidos internos de la raíz del maíz. Sobre su rol en este nicho, diversos autores señalan que promueven el crecimiento en las plantas (Tsavkelova et al. 2007; Taghavi et al. 2009), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (Estrada et al. 2002; Bhattacharjee et al. 2008), solubilizan fosfatos (Palaniappan et al. 2010; Puente et al. 2009) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Berg et al. 2005; Shiomi et al. 2006). Los géneros determinados fueron *Arthrobacter* (Chelius y Triplett 2000; McInroy y Kloepper 1995; Lalande et al. 1989), *Azospirillum* (Wurdig et al. 2007; Roesch et al. 2007; James 2000) *Bacillus* (Rai et al. 2007; Grönemeyer et al. 2011; Gao et al. 2004; McInroy y Kloepper 1995; Zinniel et al. 2002), *Bradyrhizobium* (Wurdig et al. 2007; Wurdig et al. 2007; Roesch et al. 2007; Zinniel et al. 2002), *Brevibacillus* (Grönemeyer et al. 2011), *Burkholderia* (Wurdig et al. 2007; Reis et al. 2004; Roesch et al. 2007; McInroy y Kloepper 1995, Montañez et al. 2012), *Corynebacterium* (Lalande et al. 1989; McInroy and Kloepper 1995; Zinniel et al. 2002), *Dechloromonas* (Wurdig et al. 2007; Roesch et al. 2007), *Flavobacterium* (McInroy y Kloepper 1995), *Herbaspirillum* (Wurdig et al. 2007; Baldani et al. 1986; Roesch et al. 2007, Montañez et al. 2012), *Ideonella* (Wurdig et al. 2007; Roesch et al. 2007), *Massilia* (Grönemeyer et al. 2011), *Methylobacterium* (McInroy y Kloepper 1995), *Microbacterium* (Zinniel et al. 2002; McInroy y Kloepper 1995; Grönemeyer et al. 2011), *Micrococcus* (Lalande et al. 1989; McInroy y Kloepper 199; Zinniel et al. 2002), *Pelomonas* (Wurdig et al. 2007; Roesch et al. 2007), *Phyllobacterium* (Lalande et al. 1989; McInroy y Kloepper 1995), *Pseudomonas* (McInroy y Kloepper 1995; Wurdig et al. 2007; Zinniel et al. 2002; Montañez et al. 2012), *Rhizobium* (Gutierrez-Zamora y Martinez-Romero 2001; McInroy y Kloepper 1995, Montañez et al. 2012), *Rothia* (Zinniel et al. 2002), *Ensifer* (Wurdig et al. 2007; Roesch et al. 2007), *Sphingomonas* (Grönemeyer et al. 2011; McInroy y Kloepper 1995), *Staphylococcus* (McInroy y Kloepper 1995), *Stenotrophomonas* (McInroy y Kloepper 1995), *Streptomyces* (Araujo et al. 1999), *Variovorax* (McInroy y Kloepper 1995), *Xanthobacter* (Wurdig et al. 2007; Young 1992; Roesch et al. 2007) y *Xanthomonas* (McInroy and Kloepper 1995; Rai et al. 2007; Gao et al. 2004; Zinniel et al. 2002).

6. CONCLUSIONES

1. *Ensifer medicae* es el microsimbionte específico del trébol andino (*Medicago hispida*) que crece asociado al maíz en las chacras maiceras de Allpas (Acobamba-Huancavelica, Perú).
2. Existen bacterias incapaces de formar nódulos en *Medicago hispida* que pueden encontrarse en su interior como endosimbiontes. Su función es desconocida.
3. La diversidad bacteriana, estimada como número total de géneros, de los suelos rizosféricos es similar a la de los suelos no rizosféricos en todas las chacras analizadas.
4. Las plantas estimulan el crecimiento de determinados géneros bacterianos, la mayoría de ellos con capacidad para promover el crecimiento vegetal, y cuya abundancia depende del tipo de planta.
5. La asociación maíz-trébol es la que promueve mayor abundancia de géneros bacterianos con actividad promotora del crecimiento vegetal.
6. La fertilización nitrogenada disminuye la abundancia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
7. Debe existir una extraordinaria diversidad microbiana en las chacras maiceras, como lo atestigua la cantidad de secuencias no clasificadas.
8. Las raíces de maíz amiláceo contienen numerosas bacterias endofitas, la mayoría de ellas no descritas como tales hasta la fecha. Para el análisis de diversidad microbiana de los endofitos radicales de maíz, la pirosecuenciación es más efectiva que otro método dependiente de cultivo celular.
9. Es posible que la sostenibilidad de las chacras cultivadas con maíz y trébol se deba a la diversidad y abundancia de las bacterias que expresan actividad promotora del crecimiento vegetal tanto en la rizosfera de las plantas como en el interior de las raíces. Se deduce un efecto sinérgico entre las plantas de maíz y trébol en la abundancia de tales bacterias.

6. REFERENCIAS

- Agnoli K, Lowe CA, Farmer KL, Husnain SI, Thomas MS (2006) The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function factor which is a part of the Fur regulon. *J Bacteriol* 188(10):3631-3644.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173-181.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173-181.
- Aitken Y (1981) Temperate herbage grasses and legumes. In: *Handbook of Flowering*. Halevy~ CRC, Boca Raton, Florida.
- Aitken Y (1985) Temperate herbage, grasses and legumes. In *Handbook of flowering*. (Ed. H Halevy) 185-202. (CRC Press: Boca Raton, FL).
- Akhtar M, Malik A (2000) Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology* 74: 35 - 47.
- Alikhani HA, Saleh-Rastin N, Antoun H (2007) Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In: Velazquez E, Rodriguez-Berruero C (eds) *Book Series: Developments in plant and soil sciences*. Springer, The Netherlands, pp 135-138
- Altieri M, Nicholls C (2000) *Agroecología: teoría y práctica para una agricultura sostenible*. México.
- Álvarez OG (2003) *Plan Estratégico de Desarrollo Distrital de Acobamba- Huancavelica*, Perú.
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* Nodules. *Int J Syst Bacteriol* 47: 996-1006.
- Ambrosi C, Leoni L, Putignani L, Orsi N, Visca P (2000) Pseudobactin biogenesis in the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* Strain B10: Identification and functional analysis of the L-Ornithine N5-Oxygenase (psbA) gene. *J Bacteriol* 182(21):6233-6238.
- Anandham R, Gandhi PI, Madhaiyan M, Sa T (2008) Potential plant growth promoting traits and bioacidulation of rock phosphate by thiosulfate oxidizing bacteria isolated from crop plants. *J Basic Microbiol*. doi:10.1002/jobm.200700380.
- Anderson S, Ferraes N, Gundel S, Keane B, Pound B (1997) *Cultivos de Cobertura: componentes de sistemas integrados*. Taller Regional Latino-Americano. 3-6 de Febrero 1997. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Antonini C, Arenas F, Azcarate P, Bono A, Fernández R, Kloster N, Quiroga A, Romano N, Saks M (2008) *Manual de Fertilidad y Evaluación de Suelos*. Buenos Aires-Argentina.
- Arite W, Fritze A, Hagemann M, Berg G (2002) *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1937-1944.
- Asencio G, Gimpel C, Ogue E, Dominguez M, Gonzalez G, Alegria K, Gonzalez M (2009) Caracterización de bacterias pigmentadas violeta con actividad antimicrobiana aisladas desde la Antártica. Resumen de XXXI Congreso Chileno de Microbiología.
- Ashbolt NJ, Inkerman PA (1990) Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug *Saccharococcus sacchari*, and its environs. *Appl Environ Microbiol* 56:707-712.
- Avendaño J, Del Pozo A, Ovalle C (1997) Hardseededness under field condition of *M. polymorpha* during five softening season in the Mediterranean Zone of Chile. *Proc. 18th Int. Grass. Cong., Canadá*, pp 89-90.
- Bacon CW, White JF (2000) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York
- Bacon WC, Hinton DM (1997) Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Hurst C. et al. (Eds.). *Manual of environmental microbiology*, pp.413-421.

- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol* 57:233 - 66
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55:541- 555.
- Bakker MM, Govers G, Kosmas C, Vanacker V, van Oost K, Rounsevell M (2005) Soil erosion as a driver of land use change. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 105:467-481. doi:10.1016/j.agee.2004.07.009.
- Bakker PA, Pieterse CM, van Loon LC (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:239-243.
- Balachandar D, Raja P, Kumar K, Sundaram SP (2007) Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biot Mol Biol Rev* 2: 49-57.
- Baldani JJ, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem* 29:911-922.
- Baldani VLD, Baldani JJ, Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fertil Soils* 30:485-489
- Baldini VLD, Baldini JJ, Olivares F, Döbereiner J (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13:65-73.
- Bally R, Thomas-Bauzon D, Heulin Th, Balandreau J, Richard C, De Ley J (1983) Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Canadian Journal of Microbiology* 29(8): 881-887, 10.1139/m83-143.
- Barbazán M (1998) Análisis de Plantas y Síntomas Visuales de Deficiencia de Nutrientes. Montevideo-Uruguay.
- Barbey C, Alexandre Crépin A, Cirou A, Budin-Verneuil A, Nicole Orange N, Feuilloley M, Faure D, Dessaux Y, Burini JF, Latour X (2012) Catabolic Pathway of Gamma-caprolactone in the Biocontrol Agent *Rhodococcus erythropolis*. *J. Proteome Res.* 11:206-216
- Bashan Y (1986) Inoculation of rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J Gen Microbiol* 132:3407-3414
- Beattie GA, Lindow SE (1995) The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathol* 33:145-172
- Belimov AA, Dodd IC, Hontzeas N, Theobald JC, Safronova VI, Davies WJ (2009) Rhizosphere bacteria containing ACC deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytologist* 181:413-423.
- Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem* 37:241-250.
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ, Stepanok VV (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol* 47:242-252
- Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG, Chan JWYF (1995) Endophytic bacteria in grapevine. *Can J Microbiol* 41:46-53.
- Beneduzi 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. *Appl Soil Ecol* 39:311-320.

- Benhamou N, Nicole M (1999) Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol Biochem* 37:703-719.
- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A, Squartini A (2004) Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. *System Appl Microbiol* 27:462-468.
- Bent E (2006) Induced systemic resistance mediated by plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Tuzun S, Bent E (eds) *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. Springer, New York, pp 225–258
- Bentley J, Nina S, Pérez S (2001) *Etnobotánica de las Malezas en Cochabamba*. Cochabamba-Bolivia.
- Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*. 7 (11):1673-1685 doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x
- Berg G, Egamberdieva D, Lugtenberg LB, Hagemann M (2010) Symbiotic Plant-Microbe Interactions: Stress Protection, Plant Growth Promotion, and Biocontrol by *Stenotrophomonas*. En: J. Seckbach and M. Grube (eds.), *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 17:445-460. DOI 10.1007/978-90-481-9449-0_22, c Springer Science+Business Media B.V.
- Berg G, Hallmann J (2006) Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. *Soil Biology* 9:53-69, En: *Microbial Root Endophytes*, B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora A, Ulrich A, Hallmann J (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi, *FEMS Microbiology Ecology* 5:1215-229.
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology and Ecology* 68:1-13.
- Beyhaut E, Tlustý B, van Berkum P, Graham P (2006) *Rhizobium giardinii* is the microsymbiont of Illinois bundleflower (*desmanthus illinoensis* (Michx.) Macmillan) in Midwestern prairies *Can J Microbiol* 53:903-906.
- Bibi F, Yasir M, Song GCh, Lee SY, Chung YR (2012) Diversity and Characterization of Endophytic Bacteria Associated with Tidal Flat Plants and their Antagonistic Effects on Oomycetous Plant Pathogens. *Plant Pathol. J.* 28(1):20-31.
- Binladen J, Gilbert MTP, Bollback JP, Panitz F, Bendixen C, Nielsen R, Willerslev E (2007) The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS ONE* 2:e197.
- Biondi EG, Pilli E, Giuntini E, Roumiantseva ML, Andronov EE, Onichtchouk OP, Kurchak ON, Simarov BV, Dzyubenko NI, Mengoni A, Bazzicalupo M (2003) Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiol Lett* 220:207-213.
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB, Yanni YG, Rolf BG (2000) Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agron J* 90:880-886.
- Blaž D, Prigent-Combaret C, Mirza MS, Moenne-Loccoz Y (2006) Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* 56:455-470.
- Bontemps C, Elliot GN, Simon MF, Dos Reis junior F, Gross E, Lawton R, Neto NE, Loureiro MF, Faria SM, Sprent JI, James EK, Young JPW (2010) *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 19:44-52.

- Borneman J, Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soil from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 63:2647-2653.
- Borodovsky M, McIninch D (1993) GeneMark: Parallel gene recognition for both DNA strands. *J Comput Biochem* 17:123-133.
- Bounjemate M, Robson AD, Beale PE (1992) Annual Medicago species in Morocco. II Distribution in relation to soil and climate. *Australian Journal of Agricultural Research* 43:751-763.
- Brack EA y Mendiola C (2000) *Ecología del Perú*. Asociación Editorial Bruño. 495 pp.
- Brimecombe M, De Leij FAAM, Lynch JM (2007) Rhizodeposition and microbial populations. En: *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Edited by: Roberto Pinto, Zeno Varanini y Paolo Nannipieri. Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, 73-109 pp.
- Brockman et al. (2008) Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Res.* 18:763-770.
- Brockman W, Alvarez P, Young S, Garber M, Giannouskos G, Lee WL, Russ C, Lander ES, Nusbaum C, Jaffe DB (2008) Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Res* 18:763-770.
- Brunel B, Rome S, Ziani R, Cleyet-Marel JC (1996) Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual species of *Medicago*. *FEMS Microbiol Ecol* 19: 71-82.
- Bullitta S, Floris R, Hayward MD, Loi A, Porqueddu C, Veronesi F (1994) Morphological and biochemical variation on Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. *Euphytica* 77:263-268. doi: 10.1007/BF02262640
- Burd G, Dixon DG, Glick BR (2000) Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 46:237-245.
- Burnham KP, Overton WS (1979) Robust Estimation of Population Size When Capture Probabilities Vary among Animals. *Ecology* 60(5):927-936.
- Cao P, Zhang LM, Shen JP, Zheng YM, Di HJ, He JZ (2012) Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. *FEMS Microbiol Ecol* 80:146 – 158.
- Carpaena R, Esteban E, Lucena JJ, Peñalosa, Vázquez S, Zornoza P, Gárate YA (2006) Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. En: *Fijación de Nitrógeno, Fundamentos y Aplicaciones*. 255-268. E. J. Bedmar, J. González, C. Lluch, B. Rodelas Eds. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). ISBN: 84-611-1198-5.
- Chandra S, Choure K, Dubey RC, Maheshwari DK (2007) Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Braz J Microbiol* 38:124-130.
- Chanway CP (1998) Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia*, v 50:149-170.
- Chao A, Bunge J (2002) Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics*, 58: 531-539.
- Chao A, Shen TJ (last updated April 2010). Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation). Program and Users Guide [WWW document]. URL <http://chao.stat.nthu.edu.tw> (accessed Julio 2012).
- Chávez CA y Guevara-Féfer F (2003) Flora arvense asociada al cultivo de maíz de temporal en el valle de Morelia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Chelius M, Triplett E (2001) The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* 41:252-263.

- Chen C, Bauske EM, Musson G, Rodriguezkabana R, Kloepper JW (1995) Biological control of Fusarium Wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol Control* 5:83-91
- Chen K, Pachter L (2005) Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. *PLoS Computational Biology* 1: e24. doi:10.1371/journal.pcbi.0010024.
- Chen WM, James EK, Prescott AR, Kierans M, Sprent JI (2003) Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1051-61.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 34:33-41.
- Chincholkar SB, Chaudhari BL, Talegaonkar SK, Kothari RM (2000) Microbial Iron Chelators: A sustainable tool for biocontrol of plant diseases. In: Upadhaya RK, Mukerji KG, Chamola BP (eds) *Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture*. Kluwer Academic Press, New York, pp. 49-67.
- Choi JH, Kim MS, Jung MJ, Roh SW, Shin KS, Bae JW (2010) *Sphingopyxis soli* sp. nov., isolated from landfill soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1682-1686.
- Chun J (2001) PHYDIT version 3.1. Available at <http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>
- Clarkson NM, Russel JS (1975) Phasic development of Medicago species. Flowering responses to vernalisation and photoperiod in annual medics (*Medicago* spp.). *Australian Journal of Agricultural Research* 26, 831-838. doi: 10.1071/AR9750831
- Cocking E C 2000 Helping plants get more nitrogen from the air. *European Review* 8:193-200.
- Cocks PS (1997) Seed production, seed bank dynamics and reproductive strategies of Mediterranean annual legumes. Workshop Improving forage crops for semi-arid areas Mallorca 2-4 October 1997 pag. 213-223.
- Cocks PS, Ehrman T (1987) The geographic origin of frost tolerance in Syria pasture legumes. *Journal of Applied Ecology* 24:673-683. doi: 10.2307/2403902
- Cole JR, et al. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31:442-443.
- Colwell RK (2009) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2. Users Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA (2005a) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951-4959.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clement C, Barka EA (2005b) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71:1685-1693.
- Conn VM, Walker AR, Franco CMM (2008) Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 21:208-218.
- Contesto C, Desbrosses G, Lefoulon C, Bena G, Borel F, Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B (2008) Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Sci* 175:178-189.
- Coombs JT, Michelson PP, Franco CMM (2004) Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol Control* 29:359-366.
- Costa JM, Loper JE (1994) Characterization of siderophore production by the biological-control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol Plant Microb Interact* 7:440-448.

- Coventry HS, Dubery IA (2001) Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:149-158.
- Crawford EJ, Lake AWH, Boyce KG (1989) Breeding annual Medicago species for semiarid conditions in southern Australia. *Adv. Agron.* 42:399-437
- Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:10494-10499.
- Daniel R (2005) The metagenomics of soil. *Nature Review Microbiology* 3:470-478.
- de Bruijn FJ (1992) Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:2180-2187.
- de Felipe MR (2006) Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En: Fijación de Nitrógeno, Fundamentos y Aplicaciones. pp 9-16. E. J. Bedmar, J. González, C. Lluch, B. Rodelas Eds. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). ISBN: 84-611-1198-5.
- de Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ (1997) Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils* 24:358-364.
- de Haan RL, Sheaffer CC, Barnes DK (1997) Effect of annual medic smother plants on weed control and yield in corn. *Agronomy Journal* 89: 813-821.
- De Nobili M, Contin M, Mondini C, Brookes PC (2001) Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biol Bioch* 33:1163-1170.
- Del Pozo A, Rodriguez N, Lobos C (1989) Nutrientes que limitan el crecimiento y producción de medicagos anuales en el secano interior de la zona Mediterranea subhúmeda de Chile. *Agricultura Técnica* 49(1):36-40
- del Villar M, Rivas R, Peix A, Mateos PF, Martínez-Molina E, van Berkum P, Willems A, Velázquez E (2008) Stable low molecular weight RNA profiling showed variations within *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* nodulating different legumes from alfalfa cross-inoculation group. *FEMS Microbiol Lett* 282:273-281.
- DellAmico E, Cavalca L, Andreoni V (2008) Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol Biochem* 40:74-84
- Department of Agriculture (1957) *Soil-Yearbook of Agriculture*. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- DeSantis TZ, et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S Rrna gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069-5072.
- Deshwal VK, Pandey P, Kang SC, Maheshwari DK (2003) Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Ind J Expt Biol* 41:1160-1164.
- Dimkpa C, Aleš S, Dirk M, Georg B, Erika K (2008) Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microb* 54:163-172.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* 28:871-879.
- Dodd IC, Jiang F, Garcia TR, Belimov AA, Hartung W (2009) The rhizosphere bacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 containing ACC deaminase does not increase systemic ABA signaling in maize (*Zea mays* L.). *Plant Signaling & Behavior* 4:6, 519-521.
- Dourado AC, Paula IL, Alves P, Tenreiro T, Ferreira E, Tenreiro R, Fareleira P, Barreto CM (2009) Identification of *Sinorhizobium (Ensifer) medicae* based on a specific genomic sequence unveiled by M13-PCR fingerprinting. *Int Microbiol* 12: 215-225.

- Dunne C, Crowley JJ, Moënné-Loccoz Y, Dowling DN, de Bruijn FJ, OGara F (1998) Biological control of *Phytium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiol* 143:3921-3931.
- Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, Haynes M, Breitbart M, Peterson DM, Saar MO, Alexander S, Alexander EC Jr, Rohwer F (2006) Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, 7:57 doi:10.1186/1471-2164-7-57
- Ehrman TAM, Cocks PS (1990) Ecogeography of annual legumes in Syria: distribution patterns. *Journal of Applied Ecology* 27:578-591.
- Elbeltagy AK, Nishioka K, Suzuki H, Sato NT, Sato Y, Morisaki H, Mitsui H, Minamisawa K (2000) Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci Plant Nutr* 46:617-629.
- Elizabeth P, Miguel S, Ball Maria M, Andre's YL (2007) Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol Biochem* 39:2905-2914.
- Elliott GN, Chou JH, Chen WM, Bloemberg G, Bontemps C, Martínez-Romero E, Velázquez E, Young JPW, Sprent JI, James JK (2010) *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ Microbiol* 11:762-778.
- Elmore CL (1991) Weed control by soil solarization. In: Katan, J. and DeVay, J.E. (eds) *Soil Solarization*. CRC Publications, Boca Raton, FL, USA, pp. 61-72.
- Estrada P, Mavingui P, Cournoyer B, Fontaine F, Balandreau J, Caballero-Mellado J (2002) A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48:285-294.
- Evans SP, Knezevic SZ, Lindquist JL, Shapiro ChA, Blankenship EE (2003) Nitrogen application influences the critical period for weed control in corn. *Agronomy Faculty Publications*. Paper 410. <http://digitalcommons.unl.edu/agronomyfacpub/410>.
- Ewing B, La Deana H, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185.
- Fernández L (2003) Estudio de mercado sobre fertilizantes en Perú. *Icex*. Lima-Perú.
- Ferrer M, Beloqui A, Timmis KN, Golyshin PN (2009) Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16:109-123.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88(6):1354-1364.
- Finch CV, Sharp CW (1976) *Cover Crops in California Orchards and Vineyards*. Washington, DC.: USDA Soil Conservation Service.
- Fisher PJ, Petrini O, Lappin SHM (1992) The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol* 122:299-305
- Fontes J, Gomes E, Teixeira Cl, Gomes de Paula U, Teixeira M; Corrêa G, Bressan W (2009) Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology* 40:522-534.
- Fore JJ, Wiechers IR, Cook-Deegan R (2006) The effects of business practices, licensing, and intellectual property on development and dissemination of the polymerase chain reaction: case study. *Journal of Biomedical Discovery and Collaboration*, 1:7 doi:10.1186/1747-5333-1-7
- Foster RC (1998) Microenvironment of soil microorganisms. *Biol Fertil Soils* 6:189-203.
- Francis CM, Poole ML (1973) Effect of waterlogging on annual medics. *Aust J Agric Anita Husk* 13:71-73.
- Fraser J, McCartney D, Najda H, Mir Z (2004) Yield potential and forage quality of annual forage legumes in southern Alberta and northeast Saskatchewan. *Can J Plant Sci* 84:143-155.

- Frye WW, Blevins RL (1989) Economically sustainable crop production with legume cover crops and conservation tillage. *J Soil Water Conserv* 44:57-60.
- Gaikwad GL, Gupta P, Wate SR (2011) Bio-control of waterborne pathogens using *Lactobacillus* spp. *Environ Monit Assess*. DOI 10.1007/s10661-011-2447-2
- Garau G, Reeve WG, Brau L, Yates RJ, James D, Tiwari R, O'Hara GW, Howieson JG (2005) The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. Suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant and Soil* 276:263-277.
- Garbeva P, Voesenek K, van Elsas JD (2004) Quantitative detection and diversity of the pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. *Soil Biol Biochem* 36:1453-1463.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA, Young JP (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:2037-2048.
- Ghosh S, Penterman JN, Little RD, Chavez R, Glick BR (2003) Three newly isolated plant growthpromoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem* 41:277-281.
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329-339.
- Graham P (2008) Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*, pp. 23-43. Edited by M. J. Dilworth, E.K. James, J. I. Sprent, W. E. Newton. Dordrecht: The Netherlands: Springer.
- Graziano DG, Ruisi DGP, Amato G, Giambalvo D (2010) Variation in pheno-morphological and agronomic traits among burr medic (*Medicago polymorpha* L.) populations collected in Sicily, Italy. *Crop & Pasture Science* 61:59-69.
- Grillo E (1993) Cosmovisión andina de siempre y la cosmología occidental moderna, en: PRATEC, ¿Desarrollo o descolonización en los Andes?, Lima.
- Grobman A, Salhuana W, Sevilla R (1961) Races of maize in Peru their origins, evolution and classification. National Academy of Sciences-National Research Council. Washington, D.C
- Growman A (1982) Maíz (*Zea mays*) in: Precerámico Peruano. Los gavilanes, mar, desierto y oasis en la historia del hombre: 157-179. Lima: Corporación Financiera de Desarrollo, S.A. COFIDE, Instituto Arqueológico Alemán.
- Guerrero J (1998) Interpretación de Análisis de Suelos y Recomendaciones. UNALM-Perú.
- Gundel S (1998) Participatory innovation development and diffusion. Vol 21, Kommunikation und Beratung - Sozialwissenschaftliche Schriften zur Landnutzung und Landlichen Entwicklung, Margraf Verlag, Germany.
- Guo DCh y Milewicz DM (2003) Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis. *Biotechnology Letters* 25: 2079-2083
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY (2000) Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytol* 147:617-630.
- Gutierrez-Zamora ML, Martinez-Romero E (2001) Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* 91:117-126.
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 183:2634-2645.
- Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium tolerant rice varieties. *New Phytol* 154:131-145

- Hall N (2007). Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol* 210:1518-25.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/N. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hallmann J, Berg G (2006) Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. En *Soil Biology, Volume 9. Microbial Root Endophytes*. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Klopper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895-914.
- Hamady M, Walker JJ, Harris JK, Gold NJ, Knight R (2008) Error correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods* 5:235-237.
- Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:669-685.
- Handelsman J; Rondon MR; Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5:245-249. doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9.
- Hanson BD, Schneider SA (2008) Evaluation of weed control and crop safety with herbicides in open field tree nurseries. *Weed Technology* 22:493-498
- Hanson BD, Schneider SA (2008). Evaluation of Weed Control and Crop Safety with Herbicides in Open Field Tree Nurseries. *Weed Technology* 22(3):493-498. DOI: 10.1614/WT-08-021.1
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Cell Press* 16 (10):463-71.
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235-257
- Hassink J, Bouwman LA, Zwart KB, Brussaard L (1993) Relationship between habitable pore space, soil biota, and mineralization rates in grassland soils. *Soil Biol Biochem* 25:47-55.
- Hayward AC, Fegan N, Fegan M, Stirling GR (2009) *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology* 108:756-770.
- Hekneby M, Antolín MC, Sánchez-Díaz M (2001) Cold response of annual Mediterranean pasture legumes . In Delgado I, Lloveras J. (eds.). *Quality in lucerne and medics for animal production: Qualité de la luzerne et des medics pour la production animale*. Zaragoza (Spain): CIHEAM-IAMZ, pp. 157-161.
- Hennig K, Villforth F (1940) Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Bakteriensymbiose in höheren Pflanzen und ihrer Beeinflussung durch Leitelemente. *Biochem Z* 305:299-309.
- Hernández-León R, Velázquez-Sepúlveda I, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G (2010) Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton*, 79: 133-139
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Medallo J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martinez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol* 30:87-97.
- Heur H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH (1997) Analysis of actinomycetes communities by specific amplification of gene encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradient. *Can J Microbiol* 63:3233-3241.
- Heyn CC (1963) The annual species of Medicago. In *Scripta Hierosolymitana*. Vol. 12. (Magnes Press, Hebrew University: Jerusalem)
- Hoffmann C, Minkah N, Leipzig J, Wang W, Arens MQ, Tebas P, Bushman FD (2007) DNA bar coding and pyrosequencing to identify rare HIV drug resistance mutations. *Nucleic Acids Res* 35:e91.

- Hofstetter B (1994) Bring on the medics. *The New Farm* 16:56, 62.
- Howieson JG, Ewing MA (1986) Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-Medicago symbiosis. *Aust J Agric Res* 37:55-64.
- Huang J (1991) Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology* 24:141-157.
- Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, et al. (2006) Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol* 72:2221-2225.
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, Van Montagu M, Kellenberger E (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J Bacteriol* 176:1913-1923
- Im WT, Yokota A, Kim MK, Lee ST (2004) *Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium. *J Gen Appl Microbiol* 50:249-254.
- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM (2008) Characterization of plant growthpromoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Curr Microbiol* 56:327-333
- Insunza V, Alstrom S, Eriksson KB (2002) Root bacteria from nematicidal plants and their biocontrol potential against trichodorid nematodes in potato, *Plant Soil* 241: 271-278.
- Ishii S, Sadowsky MJ (2009) Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology, and evolution. *Environ Microbiol* 11:733-740.
- Issolah R, Beloued A, Yahiaoui S (2011) Preliminary inventory of the species associated to *Sulla coronaria* (L.) Medik. (Fabaceae) in northeastern Algeria. *Pak J Weed Sci Res* 17(1):83-101.
- Jacobs MJ, Bugbee WM, Gabrielson DA (1985) Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can J Bot* 63:1262-1265.
- James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JJ, Dobereiner J (1994) Infection and colonization of sugarcane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45:757-766.
- Jatala P (1986) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann Rev Phytopathol* 24:453 - 89
- Jennings J (2005) Energetics of feasting in the prehistoric Andes. *Archaeological Papers of the American Anthropological Association* 14:241-259, ISBN 1-931303-20-7.
- Jensen PR, Lauro FM (2008) An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(1):51-62. doi:10.1007/s10482-008-9239-x.
- Jeranyama P, Hesterman OB, Sheaffer CC (1998) Medic planting date effect on dry matter and nitrogen accumulation when clear-seeded or intercropped with corn. *Agron J* 90:616-622.
- Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez LE, Tapia-Hernández A, Mascarua-Esparza MA, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 63:3676-3683.
- Jin F, Ding Y, Ding W, Reddy MS, Dilantha FWG, Du B (2011) Genetic Diversity and Phylogeny of Antagonistic Bacteria against *Phytophthora nicotianae* Isolated from Tobacco Rhizosphere. *Int J Mol Sci* 12:3055-3071. doi:10.3390/ijms12053055
- Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol* 163:459 - 480
- Jones WJ (2009) High-Throughput Sequencing and Metagenomics. *Estuaries and Coasts*. DOI 10.1007/s12237-009-9182-8.
- Jordan DC (1984) *Rhizobiaceae* Conn. En: *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. NR Krieg, JG Holt, (Eds), pp. 235-244. Williams and Wilkins, Baltimore Md. USA.

- Kamilova F, Leveau JHJ, Lugtenberg BJJ (2007) *Collimonas fungivorans*, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environ Microbiol* 9:1597-1603.
- Kan FL, Chen ZY, Wang ET, Tian CF, Sui XH, Chen WX (2007) Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Arch Microbiol* 188:103-115.
- Karns JS, Mulbry WW, Nelson JO, Kearney PC (1986) Metabolism of carbofuran by a pure bacterial culture. *Pestic Biochem Physiol* 25:211-217.
- Killham K, Prosser JI (2007) The prokaryotes. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Ed. E.A Paul, pp. 119-144. Academic Press, Oxford.
- Killham K (1994) *Soil Ecology*. Cambridge University Press
- Kim SJ, Weon HY, Kim YS, Anandham R, Yoo SH, Park ICh, Kwon SW (2010) *Kaistia terrae* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 949-952.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- Klee GA (1980) *World Systems of Traditional Resource Management*, Wiley, New York.
- Kloepper JW, Schippers B, Bakker PAHM (1992) Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology* 82:726-727.
- Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes in: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Vol 2.
- Kluepfel DA (1993) The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annu Rev Phytopathol* 31:441-472
- Knezevic SZ, Evans SP, Blankenship EE, Van Acker RC, Lindquist JL (2002) Critical period for weed control: the concept and data analysis. *Weed Sci* 50:773-786.
- Kobayashi DY, Palumbo JD (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, pp 199-236
- Kumar PS, Brooker MR, Dowd SE, Camerlengo T (2011) Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S Pyrosequencing. *PLoS ONE* 6(6): e20956. doi:10.1371/journal.pone.0020956
- Kwon SW, Park JY, Kim JS, Kang JW, Cho YH, Lim Ck, Parker MA, Lee GB (2005) Phylogenetic analyses of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 263-270.
- Kyselkova M, Kopecky J, Frapolli M, De'fago G, Sa'gova'-Mareckova M, Grundmann GL, Moe'ne-Loccoz Y (2009) Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME J* 3:1127-1138.
- Ladygina N, Hedlund K (2010) Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 42:162-168.
- Laguette 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.
- Lal R (1975) Role of mulching techniques in tropical soil and water management. IITA Tech. Bull. 1. Int Inst Trop Agr, Ibadan, Nigeria.
- Lal R (1998) Soil erosion impact on agronomic productivity and environment quality. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17(4):319-464. doi:10.1016/S0735-2689(98)00363-3.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

- Lee S, Flores-Encarnacion M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla E, Kennedy C (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. *J Bacteriol* 186:5384-5391.
- Lee WH, Yu HS, Liu QM, Jung HM, An DS, Im WT, Jin FX, Lee ST (2007) *Kaistia granulii* sp. Nov. isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2280-2283.
- Lelievre F, Porqueddu C (1994) Vegetative growth and seed production in annual medics. Proc. 3rd ESA Congress, Abano Padova (Italy).
- León R, Zapata A (2008) Chicha peruana, una bebida, una cultura. Fondo Editorial San Martín de Porres. Lima
- Lesins KA, Lesins I (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenetic study. (W Junk Publishers: The Hague, Boston, London)
- Li S, Jochum CC, Yu F, Zaleta-Rivera K, Du L, Harris SD, Yuen GY (2008) An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: antimicrobial activity and role in plant disease control. *Phytopathology* 98:695-701
- Li WJ, Zi WJ, Ark DJ, Li ChT, Xu LH, Kim ChJ, Jiang ChL (2004) *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1811-1814.
- Litterick AM, Harrier LA, Wallace P, Watson CA, Wood M (2004) The role of uncomposted materials, composts, manures and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production - A review. *Crit Rev Plant Sci* 23:453-479.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Loi A, Howieson JG, Cocks PS, Caredda S (1993) The adaptation of *Medicago polymorpha* to a range of edaphic and environmental conditions: effect of temperature on growth, and acidity stress on nodulation and nod gene induction. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 33:25-30. doi: 10.1071/EA9930025
- Loi PA, Cocks PS (1996) Hardseededness and pattern of hard seed breakdown in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* under field conditions. *The Journal of Agricultural Science* 12:161-168, doi:10.1017/S0021859600073093
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Ludwig W, Schleifer KH (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* 15:155-173.
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-556.
- Lynch JM (1990) Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotech Adv* 8:335-346
- Ma W, Sebastianova SB, Sebastian J, Burd GI, Guinel FC, Glick BR (2003) Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83:285-291.
- Madhaiyan M, Kim BY, Poonguzhali S, Kwon SW, Song MH, Ryu JH, Go SJ, Koo BS, Sa TM (2007) *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:326-331.

- Mahaffee WF, Kloepper JW (1994) Applications of plant growth-promoting Rhizobacteria in sustainable agriculture. In: Pankhurst CE, Double BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) soil biota - management in sustainable farming systems. CSIRO Adelaide, Australia, pp 23-31
- Malarvizhi P, Ladha JK (1999) Influence of available nitrogen and rice genotype on associative nitrogen fixation. *Soil Sci Soc Am J* 63:93-9.
- Manrique ChA (1997) El maíz en el Perú. Concytec. Perú.
- Manter DK, Delgado JA, Holm DG, Stong RA (2010) Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb Ecol.* 60:157-166. DOI 10.1007/s00248-010-9658-x
- Margulies et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437:376-380.
- Martin M, Williams II (2006) Planting date influences critical period of weed control in sweet corn. *Weed Science* 54:928-933.
- McCaig AE, Glover L, Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol* 65:1721-1730.
- McInroy JA, Kloepper JW (1995a) Population dynamics of endophytic bacteria in field grown sweet corn and cotton. *Can J Microbiol* 41:895-901.
- McInroy JA, Kloepper JW (1995b) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337-342.
- Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G (2007) *Azospirillum zea* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2805-2809
- Mera N, Iwasaki K (2007) Use of plate-wash samples to monitor the fates of culturable bacteria in mercury-and trichloroethylene-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:437-445.
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31-46.
- Meyer M, Stenzel U, Hofreiter M (2008) Parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Nat Protoc* 3:267-278.
- Misaghi IJ, Donndelinger CR (1990) Endophytic bacteria in symptom-free Cotton plants. *Phytopathology* 80:808-811.
- Mocali S, Benedetti A (2010). Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* 161: 497-505.
- Montañez A, Rodríguez BA, Barlocco C, Beracochea M, Sicardi M (2012) Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology* 58:21-28
- Morales-García YE, Duque E, Rodríguez-Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras RD, Pérez-y-Terrón R, Muñoz-Rojas J (2010) Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología* 14 (2):11-29
- Morgan J, Bending G, White P (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1729-1739.
- Morrison TB, Ma Y, Weis JH, Weis JJ (1999) Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *J Clin Microbiol* 37:987-992.
- Muhammad LS, Khan ZUD, Cheema TA (2009) Distribution of weeds in wheat, maize and potato fields of Tehsil Gojra, district Toba Tek Singh, Pakistan. *Pak. J. Weed Sci. Res.* 15(1): 91-105

- Müller H, Schmidt C, Egamberdieva D, Lugtenberg B, Berg G (2008) New insights into the mode of action of *Stenotrophomonas* - PGPR and opportunistic human pathogen. En: 8th International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. USA.
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262 (4):56-65.
- Muresu R, Polone E, Sulas L, Baldan B, Tondello A, Delogu G, Cappuccinelli P, Alberghini S, Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Mori B, Calamassi R, Dazzo FB, Squartini A (2008) Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol Ecol* 63:383-400.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:27-141.
- Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, Mizutani J, Tahara S (1999) Possible Role of Xanthobaccins Produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in Suppression of Sugar Beet Damping-Off Disease. *Appl Environ Microbiol* 65:4334-4339.
- National Research Council. 1989. *Alternative Agriculture*. Nat. Res. Council, Nat. Acad. Press, Washington, D. C. 448 pp.
- Newman LA, Reynolds CM (2005) Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23 (1):6-8.
- Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Alley MR, Ohta N, Maddock JR, Potocka I, Nelson WC, Newton A, Stephens C, Phadke ND, Ely B, Deboy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Kolonay JF, Sumit J, Craven MB, Khouri H, Shetty J, Berry K, Utterback T, Tran K, Wolf A, Vamathevan J, Ermolaeva M, White O, Salzberg SL, Venta JC, Shapiro L, Fraser CM, Eisen J (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4136-4141
- Nistche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W (1999) Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Che* 45:1932-1937.
- Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, Aas JA, Paster BJ, DeSantis TZ, Brodie EL, Malamud D, Poles MA, Pei Z (2010) Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J Gastroenterol* 16(33):4135-4144.
- Nyrén P (2001) Method for sequencing ADN based on the detection of the release of pyrophosphate and enzymatic nucleotide degradation. Patents: US 6 258 568BI and WO98/28440.
- Oger PM, Mansouri H, Nesme X, Dessaux Y (2004) Engineering root exudation of *Lotus* toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microb Ecol* 1:96-103.
- ONERN.1976. *Mapa Ecológico del Perú. Guía explicativa*. Lima-Perú.
- Ovalle C, Avendaño J, Del Pozo A, Crespo D (1993) Germplasm collection, evaluation and selection of naturalized *Medicago polymorpha* in the mediterranean zone of Chile. *XYII International Grassland Congress, New Zealand*: 222-223.
- Ovreas L, Torsvik V (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol* 36:303-315.
- Pace NR (2009) Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73:565-576.

- Parameswaran P, Jalili R, Tao R, Shokralla S, Gharizadeh B, Ronaghi M et al. (2007) A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Res* 35: e130.
- Park MS, Jung SR, Lee MS, Kim KO, Do JO, Lee KH, Kim SB, Bae KS (2005) Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *J Microbiol* 43:219-227.
- Patriquin DG, Dobereiner J (1978) Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can J Microbiol* 24:734-742.
- Patriquin DG, Dobereiner J, Jain DK (1983) Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can J Microbiol* 29:900-915
- Paul EA (2007) *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*, 3rd ed. Academic Press: San Diego.
- Pei A, Nossa CW, Chokshi P, Blaser MJ, Yang L, et al. (2009) Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *PLoS ONE* 4(5):e5437. doi:10.1371/journal.pone.0005437
- Pereira P, Ibañez F, Rosenblueth M, Etcheverry M, Martinez-Romero E (2011) Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *ISRN Ecology*. Article ID 938546, doi:10.5402/2011/938546
- Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic MDJ (2009) Metagenomic Pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*. 55(5):856-866. doi:10.1373/clinchem.2008.107565.
- Philipson MN, Blair ID (1957) Bacteria in clover root tissue. *Can. J. Microbiol.* 3:125-129.
- Phillipot L, Hallin S, Schloter M (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Adv Agron* 96: 250-305.
- Piaggese A (2004) *Los microelementos en la Nutrición Vegetal*. Italia.
- Piano E, Francis CM (1992) The annual species of *Medicago* in the Mediterranean region, ecogeography and related aspects of plant introduction and breeding. In: *Proceedings of the Xth International Conference of the EUCARPIA Medicago spp Group*, 373-385.
- Piano E, L. Pecetti (2010) Minor Legume Species. B. Boller et al. (eds.), *Fodder Crops and Amenity Grasses*, 477 *Handbook of Plant Breeding* 5, DOI 10.1007/978-1-4419-0760-8_20, C_Springer Science+Business Media, LLC.
- Pimentel D (2006) Soil erosion: a food and environmental threat. *Environment, Development and Sustainability* 8:119-137. doi:10.1007/s10668-005-1262-8.
- Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (2001) The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil component, plants and microorganisms. In: *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil plant interface*, Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. (eds.), pp. 1-18. Marcel Dekker, New York.
- Pirttilä AM, Joensuu P, Pospiech H, Jalonen J, Hohtola A (2004) Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiol Plantarum* 121:305-312
- Pliego C, Ramos C, de Vicente A, Cazorla FM (2011) Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340:505-520 DOI 10.1007/s11104-010-0615-8
- Programa Mundial de Alimentos (PMA) (2009) *Señas ancestrales como indicadores biológicos de alerta temprana*. Lima, Perú. 92 p.
- Pruesse E, et al. (2007). *SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB*. *Nucleic Acids Res*. 35:7188-7196.

- Puckridge DW, French RJ (1983) The annual legume pasture in cereal-lay farming systems of Southern Australia: a review. *Agric. Ecosyst Environ* 9: 229-267.
- Rai R, Dash P, Prasanna B, Singh A (2007) Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World J Microbiol Biotechnol* 23:853-858.
- Rajcan I, Swanton CJ (2001) Understanding maize-weed competition: resource competition, light quality and the whole plant. *Field Crops Res* 71:139-150.
- Ramos-Solano B, Lucas GJA, Garcia-Villaraco A, Algar E, Garcia-Cristobal J, Gutierrez MFJ (2010) Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Soil* 334 (1-2):189-197, DOI: 10.1007/s11104-010-0371-9
- Ranjard L, Richaume A (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res maicroboil* 152:707-716.
- Raupach GS, Kloepper JW (1998) Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158 - 1164.
- Raza W, Wu H, Shah MAA, Shen Q (2008) A catechol type siderophore, bacillibactin: biosynthesis, regulation and transport in *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol*, 48: n/a. doi: 10.1002/jobm.200800097
- Read DC (1987) Greatly accelerated microbial degradation of Aldicarb in re-treated field soil, in flooded soil, and in water. *J Econ Entomol* 80: 156-163.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K, De-Ley J (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43:574-584.
- Reis DJFB, Da Silva LG, Reis VM, Dobereiner J (2000) Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugar cane genotypes Pesqui. *Agropecu Bra* 35:985-994
- Reitz M, Oger P, Meyer A, Niehaus K, Farrand SK, Hallmann J, Sikora RA (2002) Importance of the O-antigen, core-region and lipid A of rhizobial lipopolysaccharides for the induction of systemic resistance in potato to *Globodera pallida*. *Nematology* 4:73-79.
- Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004) Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annual Review of Genetics* 38:525-552.
- Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol* 28:829-836.
- Rivas R, Velázquez E, Willems A, et al. (2002) A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* 68:5217-22.
- Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM (2003) Extraction of ADN from soil of ADN from soil. *Eur J soil Boil* 39:183-190.
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319-339
- Roesch L, Camargo F, Bento F, Triplett E (2008) Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil* 302:91-104
- Rolf D (2004) The soil metagenome-a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current opinion in biotechnology* 15(3):199-204.
- Rome S, Brunel B, Fernández MP, Normand P, Cleyet-Marel JC (1996b) Evidence of two genomic species of *Rhizobium* associated with *Medicago truncatula* revealed by PCR/RFLP an DNA/DNA hybridizations. *Arch Microbiol* 165: 285-288.
- Rome S, Fernandez MP, Brunel B, Normand P, Cleyetmarel JC (1996a) *Sinorhizobium medicae* sp nov. isolate from annual *Medicago* spp. *Int J Sist bacteriol* 46:972-980.
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on ADN sequencing. *Genome Res* 11:3-11

- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time ADN sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242:84-9.
- Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate detection. *Science* 281:363-365.
- Rondon M, Goodman M, Handelsman J (1999) The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology* 17:403-409.
- Rosello MR, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25:39-67.
- Rosenblueth M, Martinez L, Silva J, Martinez-Romero E (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol* 27:27-35.
- Rothberg JM, Leamon JH (2008) The development and impact of 454 sequencing. *nature biotechnology*, volume 26. doi:10.1038/nbt1485
- Rótolo G, Francis Ch, Ulgiati S (2010) Rainfed agroecosystems in south america: evaluation of performance and environmental sustainability. P. Tow et al. (eds.), *Rainfed Farming Systems*, DOI 10.1007/978-1-4020-9132-2_21, 561. © Springer Science+Business Media B.V. 561-601 pp.
- Russo A, Vettori L, Felici C, Fiaschi G, Morini S, Toffanin A (2008) Enhanced croppropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *J Biotechnol* 134(3-4):312-319
- Ryu CM, Kim J, Choi O, Kim SH, Park CS (2006) Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biol Control* 39:282-289
- Sahgal M, Johri BN (2003) The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*. 84:43-48.
- Saitou N, Nei M (1987) A neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 44: 406-425.
- Samish Z, Etinger-Tulczynska R, Bick M (1961) Microflora within healthy tomatoes. *Appl Microbiol* 9:20-25.
- Sánchez-Díaz M, Hekneby M, Antolín MC (2000) Cold tolerance of forage legumes growing in controlled continental Mediterranean conditions . In Sulas L. (ed.) . *Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses = Légumineuses pour cultures fourragères, pâturages et autres usages en région méditerranéenne* . Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 265-270
- Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*. 31:107-133.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49:155-179.
- Saxena AK, Tilak KVBR (1998) Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. *In* *Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment*, Malhotra Publ Co, New Delhi. Edited by Verma AK, 25-64.
- Sayers EW, et al. (2009) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 37:D5-D15.
- Schloss et al. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23):7537-41
- Schloss PD, Westcott SL (2011) Analysis approaches for 16S rRNA gene sequence operational taxonomic unit-based. *Appl Environ Microbiol* 77(10):3219.
- Schmalenberger A, Tebbe CC (2002) Bacterial community composition in the rhizosphere transgenic, herbicide resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiol Ecol* 40:29-37.

- Schneider M, de Bruijn FJ (1996) Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J Microbiol Biochnol* 12:163-174.
- Schuster SC (2008) Next-generation sequencing transforms today's biology». *Nature Methods* 5:16-18.
- Schwieger F, Tebbe CC (1998) A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64, 4860-4876.
- Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Nazim S, Gupta AD, Mishra PK, Gupta HS (2008) Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World J Microbiol Biotechnol* 24:955-960.
- Selvaraj P, Madhaiyan M, Sa T (2008) Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. *J Microbiol Biotechnol* 18:773-777.
- Senthilkumar M, Madhaiyan M, Sundaram SP, Kannaiyan S (2009) Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). *Microbiol Res* 164:92-104.
- Sentinelli F, Lovari S, Vitale M, Giorgi G, di Mario U, Baroni MG (2000) A simple method for non-radioactive PCR-SSCP using MDET gel solution and a midi gel format: application for the detection of variants in the GLUT1 and CTLA-4 genes. *J Biotechnol* 78:201-201.
- Serratos JA (2009) El origen y la diversidad del maíz en el continente Americano. Universidad Autónoma de México. México.
- Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, Wilhelm E (2002) Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 39:23-32.
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif mutant strains. *Mol Plant Microbe Interact* 14:358-366
- Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA (2006) Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett Appl Microbiol* 42:155-159.
- Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA, Khalid A (2006) Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the
- Sharma, J. (1997) Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* associated with sugarcane. MSc Dissertation, Aligarh Muslim University, Aligarh.
- Sharrock KR, Parkes SL, Jack HK, Rees-George J, Hawthorne BT (1991) Involvement of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. hybrid Delicia). *New Zealand J Crop Hort Sci* 19:157-165.
- Sheaffer CC, Gunsolus JR, Grimsbo Jewett J, Lee SH (2002) Annual Medicago as a smother crop in soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188:408-416.
- Sheaffer CC, Lake AWH (1997) Legumes in cropping systems: approaches in Midwest United States and Southern Australia In: J. G. Buchanan-Smith, L. D. Bailey, and P. McCaughey (eds), *Proceedings of the XVIII International Grassland Congress*, pp. 349-354. Association Management Centre, Calgary, Canada.
- Sheaffer CC, Simmons SR, Schmitt MA (2001) Annual medic and berseem clover dry matter and nitrogen production in rotation with corn. *Agronomy Journal* 93:1080-1086.

- Shen JP, Zhang LM, He JP (2011) Abundance of archaea, crenarchaea and bacteria in selected agricultural soils of China. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 22(11):2996-3002.
- Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10):1135-1144.
- Sheng XF, Xia JJ (2006) Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64:1036-1042.
- Shiferaw B, Prasanna BM, Hellin J, Bänziger M (2011) Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Sec.* 3:307-327, DOI 10.1007/s12571-011-0140-5
- Shiomi H, Alves SH, Soares I, Vieira F, Wagner B (2006) Bioprospecting Endophytic Bacteria for Biological Control of Coffee leaf rust. *Sci. Agric.* v.63, n.1, 32-39.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental ADN research. *Molecular Ecology*. 21, 1794-1805. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x
- Shrestha RK, Ladha JK (1996) Genotypic variation in promotion of rice dinitrogen fixation as determined by ¹⁵N dilution. *Soil Sci Soc Am J* 60:1815-1821
- Siddiqui IA, Ehteshamul-Haque S, Shaikat SS (2001) Use of rhizobacteria in the control of root rot-root knot disease complex of mung bean. *J Phytopathol* 149:337-346
- Silva C, Ling KF, Martínez-Romero E (2007) Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico. *FEMS Microbiol Ecol* 60:477-489.
- Simpson J (1997) Amplified fragment length polymorphisms. *Bol Soc Bot Mex* 60:73-76.
- Sitzia M, Fois N (1999) Semi e legumi di *Medicago polymorpha* L. come risorsa estiva per gli ovini in ambiente mediterraneo (Seeds and pods of *Medicago polymorpha* L as a forage resource for sheep in a Mediterranean environment). *Rivista di Agronomia* 33:185-188.
- Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe C (2007) Bacterial diversity assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?. *J Microbiol Methods* 69:470-479.
- Sogin M, Morrison H, Huber J, Welch D, Huse S, Neal P, Arrieta J, Herndl G (2006) Microbial diversity in the deep sea and the under explored rare biosphere. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 103:12115-12120.
- Sogin SJ, Sogin ML, Woese CR (1971) Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *Journal of Molecular Evolution* 1:173-184.
- Song OR, Lee SJ, Lee YS, Lee SC, Kim KK, Choi YL (2008) Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Brazil J Microbiol* 39:151-156.
- Soto D, Sukumar S (1992) Improved detection of mutations in the p53 gene in human tumors as single stranded conformation polymorphisms and double stranded heteroduplex DNA. *PCR Method Appl* 2:96-99.
- Sridevi M, Yadav NCS, Mallaiiah KV (2008) Production of Indole-acetic-acid by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *Res J Microbiol* 3:276-281.
- Stajković O, De Meyer S, Miličić B, Willems A, Delić D (2009) Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *Botanica Servica* 33: 107-114.
- Stein RA (2008). Next-Generation Sequencing Update. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 28
- Stoesser G et al. (2003) The EMBL Nucleotide Sequence Database: major new developments. *Nucleic Acids Res* 31:17-22.

- Sturz AV (1995) The role of endophytic bacteria during seed decay and potato tuberization. *Plant Soil* 75:257-263
- Sturz AV, Nowak J (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl Soil Ecol* 15:183-190.
- Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, Gouzy J, Brown SD, Elliot RM, Fleetwood DJ, Mc Callum NG, Rossbach U, Stuart GS, Weaver JE, Webby RJ, De Bruijn FJ, Ronson CW (2002) Complete sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184:3086-3095.
- Sustainable Agriculture Network - USDA (2007) *Managing Cover Crops Profitably*. USA, Third. Edition. 248 p.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18:448-459.
- Taurian T, Ibañez F, Fabra A, Aguilar OM (2006) Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. *Plant Soil* 282:41-52.
- Taylor GB, Ewing MA (1992) Long-term patterns of seed softening in some annual pasture legumes in a low rainfall environmental. *Aus J Exp Agric* 32:331-337.
- Thakuria D, Taleekdar NC, Goswami C, Hazarika S, Boro RC, Khan MR (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr Sci* 86 (7):978-985
- Thomson EF, Rihawi, Cocks PS, Osman AM, Russi L (1990) Recovery and germination rates of seeds of Mediterranean medics and clovers offered to sheep at a single meal or continuously. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 144:295-299.
- Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EGH (2005) *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71:7292-7300.
- Timmusk S, Wagner EGH (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant-Microbe Interact* 12:951-959.
- Tivoli, Baranger AB, Sivasithamparam K, Barbetti MJ (2006) Annual Medicago: From a Model Crop Challenged by a Spectrum of Necrotrophic Pathogens to a Model Plant to Explore the Nature of Disease Resistance. *Annals of Botany* 98: 1117-1128, doi:10.1093/aob/mcl132.
- Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science* 10 May 2002: 1064-1066. DOI:10.1126/science.1071698
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FD (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:782-787.
- Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240-245.
- Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296:1064-1066.
- Tran VV, Berge O, Balandreau J, Ngô Kê S, Heulin T (1996) Isolement et activité nitrogénasique de *Burkholderia vietnamiensis*, bacterie fixatrice d'azote associée au riz (*Oryza sativa* L) cultivé sur un sol sulfaté du Vietnam. *Agronomie* 16:479-491.
- Trevet IW, Hollis JP (1948) Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology* 38:960-967.
- Tringe S, et al. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* 308:554-557.

- Trivedi P, Sa TM (2008) *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr Microbiol* 56:140-144.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research* 162:69-76.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2005) Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74:46-53
- Ueki T, Lovley DR (2010) Novel regulatory cascades controlling expression of nitrogen-fixation genes in *Geobacter sulfurreducens*. *Nucleic Acids Research* 38 (21):7485-7499, doi:10.1093/nar/gkq652
- Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2), 281-288 doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00117.x
- USDA (2000) *Managing Cover Crops Profitably*. Sustainable Agriculture Network, National Agricultural Library. Beltsville, MD 20705-2351.
- Valladolid J (2003) Mama “sara” (Madre Maíz): Crianza ritual de la diversidad de maíces en los Andes del Perú. En: G. Esteva y C. Marielle (Coordinadores). 62-82 pp. Sin maíz no hay país. Museo Nacional de Culturas Populares, México, D.F.
- Valladolid RJ (1994) *Agricultura Campesina Andina: Crianza de la diversidad de la vida en la chacra*. En: Crianza Andina de la Chacra. PRATEC. 2da. Versión. Lima
- van Elsas JD, Trevors JT, Starodub ME (1998) Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol Lett* 53:299-306.
- van Kessel J, PE Salas (2002) *Señas y señaleros de la santa tierra: Agronomía andina*. Abya Yala, Quito, Ecuador, y IECTA, Iquique, Chile. 309 p.
- van Kessel J, Condori D (1992) *Criar la Vida: Trabajo y Tecnología en el Mundo Andino*, Vivarium, Santiago, Chile. 183 p.
- Van Oosten VR, Bodenhausen N, Reymond P, Van Pelt JA, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ (2008) Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microb Interact* 21:919–930. doi:10.1094/MPMI-21-7-0919
- Vargas C, De Padua VLM, Nogueira ED, Vinagre F, Masuda HP, Da Silva FR, Baldani JJ, et al. (2003) Signalling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. *Symbiosis*, 35:159-180.
- Vazquez P, Holguin G, Puente M, Elopez CA, Bashan Y (2000) Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. *Biol Fertil Soil* 30:460-468.
- Velázquez E, Mateos PF, Trujillo M, Rivas R, Martínez-Molina E (2006) Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. En: *Fijación de Nitrógeno, Fundamentos y Aplicaciones*. pp. 45-52. E. J. Bedmar, J. González, C. Lluch, B. Rodelas Eds. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). ISBN: 84-611-1198-5.
- Versalovic JV, de Bruijn FJ, Lupski JR (1998) Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. de Bruijn FJ, Lupski JR, Weinstock GM (eds). New York, NY, USA: Chapman & Hall, pp. 437-454.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Vibrans H (1999) Epianthropochory in Mexican weed communities. *American Journal of Botany* 86(4):476-481.

- Villagarcia S (2010) Sulfato de Amonio Sulf-NTM de Honeywell en Maíz: Beneficios del uso del sulfato de amonio en la fertilización del cultivo de maíz en el Perú, en condiciones de Costa y Selva (maíz amarillo duro), y de Sierra (maíz amiláceo). UNALM-Perú.
- Villarias Moradillo JL (2000) Las malezas invasoras del cultivo de maíz y su control. En: Cultivos extensivos. Vida rural, ISSN 1133-8938, N° 104, 2000, págs. 42-45 Universidad de León, España.
- Villiers TA (1972) Seed dormancy. In: Kozlowski TT. (ed.) Seed Biology, Vol. II, Germination Control, Metabolism and Pathology. New York, USA: Academic Press.
- Vincent J (1970) A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15. Blackwell. Oxford.
- Vincent JM (1988) The role of legume, *Rhizobium*, and environments in nitrogen fixation. Constraints on symbiotic potential and their removal. In: Beck DP, Materon LA, eds. Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 275-285.
- Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martinez-Romero E (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation. Mol Phylogenet Evol 34:29-54.
- Volker L, Panstruga R (2005) Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. Curr Opin Plant Biol 8:625-631.
- Von der Weid I, Duarte GF, van Elsas JD, Seldin L (2002) *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogenfixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. Int J Syst Evol Microbiol 52:2147-2153.
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, Wettstein D, Franken P, Kogel KH (2005) The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc Natl Acad Sci USA 102:13386-13391
- Walsh MJ, Delaney RH, Goose RW, Krall JM (2001) Performance of annual medic species (*Medicago* spp.) in Southeastern Wyoming. Agronomy Journal 93:1249-1256.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2008) Chromium reducing and plant growth promoting Mesorhizobium improves chickpea growth in chromium amended soil. Biotechnol Lett 30:159-163.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2008) Chromium reducing and plant growth promoting Mesorhizobium improves chickpea growth in chromium amended soil. Biotechnol Lett 30:159-163.
- Weaver SE, Tan CT (1983) Critical period of weed interference in transplanted tomatoes (*Lycopersicon esculentum*): growth analysis. Weed Sci 31:476-481.
- Wei GH, Wang T, Tan ZY, Zhu ME, Chen WX (2002) *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. Int J Syst Evol Microbiol 52:2231-2239.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173: 697-703.
- Weller D (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu Rev Phytopathol 26:379-407
- Weon HY, Lee ChM, Hong SB, Kim BY, Yoo SH, Kwon SW, Go SJ (2008) *Kaistia soli* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. Int J Syst Evol Microbiol 58:1522-1524.
- Weyens NS, Monchy S, Vangronsveld J, Taghavi S, van der Lelie D (2010) Plant-Microbe Partnerships. En: K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_189, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52:487-511.
- Whitesides SK, Spotts RA (1991) Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology* 81:453-457.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:6578-6583.
- Willems A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3-14.
- Williams MM (2006) Planting date influences critical period of weed control in sweet corn. *Weed Science* 54:928-933.
- Winters RD, Winn WC (2010) A simple, effective method for bacterial culture storage: A brief technical report. *Journal of Bacteriology and Virology* 40(2):99-101 DOI 10.4167/jbv.2010.40.2.99
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51, 221-271.
- Woese, CR, Fox GE, Zablen L, Uchida T, Bonen L, Pechman K, Lewis BJ, Stahl D (1975) Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254:83-86.
- Wolinsky GJM, Dunbar J (2005) Computation improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309:1387-1390.
- Wurdig RLF, Fulthorpe RR, Seminoti JRJ, Menezes BF, Oliveira CFA (2010) Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1503-1508.
- Wurdig RLF, Luciane Maria Pereira PLM, Menezes BF, Eric W. Triplett EW, Oliveira CFA (2007) Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. *R Bras Ci Solo* 31:1367-1380.
- Xu M, Fujita D, Hanagata N (2009) Perspectives and challenges of emerging single-molecule ADN sequencing technologies. *Small* 5:2638-2649.
- Yasmin S, Rahman M, Hafeez FY (2004) Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils. *J Basic Microbiol* 44:241-252
- Yoneyama T, Muraoka T, Kim TH, Dacanay EV, Nakanishi Y (1997) The natural 15N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant Soil* 189:239-244
- You CB, Lin M, Fang XJ, Song W (1995) Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. *Soil Biol Biochem* 7:463-466
- Young JPW (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. pp. 43-86. In: *Biological Nitrogen Fixation*, Stacey, G., Burris, R.H., and Evans, H.J. (Eds.). New York: Chapman and Hall.
- Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C (2010) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol Fertil Soils*. DOI 10.1007/s00374-011-0548-2
- Zakhia F, de Lajudie P (2006) Modern bacterial taxonomy: application to bacteria that nodulate leguminous plants (BNL). *Can J Microbiol* 52:169-181.
- Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P (2006) Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb Ecol* 51: 375-93.
- Zamora C y Medina P (1969) Inventario de suelos del Perú (segunda aproximación). Lima: ONERN.
- Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, Hugenholtz P, Kim H, Kamagata Y, Nakamura K (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate accumulating microorganism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1155-1163

- Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G (2011) The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*. 38: 95 - 109
- Zhang X, Sun L, Qiu F, McLean R, Jiang R, Song W (2008) *Rheinheimera tangshanensis* sp. nov., a rice root-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2420-2424.
- Zhang X, Xiaotong MA, Weidong CA, Shanjun WE, Jianhui CA, Jiang R (2010) Phylogenetic Diversity of Rhizobial Bacteria Isolated from *Astragalus sinicus*. *Chin J Appl Environ Biol* 16: 380-384.
- Zhu Y, Sheaffer CC, Russelle MP, Vance CP (1998) Dry Matter Accumulation and Dinitrogen Fixation of Annual Medicago Species. *Agron J* 90:103-108
- Zhu Y, Sheaffer CC, Russelle MP, Vance CP (1998) Dry Matter Accumulation and Dinitrogen Fixation of Annual Medicago Species. *Agron J* 90:103-108
- Zimmerer KS (1993) Soil erosion and labor shortages in the Andes with special reference to Bolivia, 1953-1991: Implications for conservation-with-development. *World Development*, 21(10), 1659-1675. doi:10.1016/0305-750X(93)90100-N.
- Zribi K, Mhamdi R, Huguet T, Aouani ME (2004) Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. *Soil Biochem* 36:903-908.