

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

Caracterización por metagenómica de la microbiota rizosférica nativa de *Opuntia ficus indica* var. *inermis* y evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus
Tumbes, Perú, 2014 – 2015.



**Caracterización por metagenómica de la microbiota rizosférica
nativa de *Opuntia ficus indica* var. *inermis* y evaluación de los
efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus
Tumbes, Perú, 2014 – 2015.**

RESPONSABLES.

Autor : Ing. Jalmer Fidel Campaña Olaya. M.Sc

Coautor (es) : Ing. Zoo. Héctor Sánchez Suárez. M.Sc
MV. Eveling Prada Gutiérrez.

Asesor : Doctor de Estado. PhD. Eric Louis Mialhe,
Inca'Biotec SAC.

Alumnos : Blgo. Bernabé Salomón Luis Alaya, M Sc (c).
MV. Fredy Fabián Domínguez, M Sc (c).
Br.CCBB. Melitza Cornejo La Torre, M Sc (c).
Br. C.A. Estefanía Aimi Nouchi Moromizato.

Tumbes, Perú

2016

AGRADECIMIENTOS

Al asesor del proyecto PhD. Eric Louis Mialhe por haber brindado su amistad y orientación con mucho profesionalismo y paciencia, por compartir sus conocimientos, los cuales hicieron realidad este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento al Mc. Bernabé Luis Alaya por brindar su apoyo en la parte de biología molecular de este proyecto, por la paciencia y el tiempo dedicado y por compartir sus conocimientos.

Gracias a la Br. Sandra Mendez Farroñan por el apoyo en la identificación y caracterización de las bacterias presentes en la rizósfera como parte de este proyecto.

Gracias a la Br. Marilyn Quezada Salirrosas por apoyar en la parte de identificación y caracterización de micorrizas, como parte de este proyecto.

Gracias a la Br. Nayda Munaya Sáenz por el apoyo en la parte de evaluación de las cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus.

Al Sr Humberto García Neyra por su valioso apoyo y colaboración en las diversas etapas de la Micropropagación del presente trabajo de investigación.

Gracias al equipo técnico de laboratorio, César Chanta por su apoyo en la parte de Biología Molecular y Pedro Masías por su apoyo en la parte de Proteómica, gracias por su amistad y el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Gracias por todo y que Dios los bendiga siempre.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	3
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
IV.	RESULTADOS.....	21
V.	DISCUSIÓN.....	35
VI.	CONCLUSIONES.....	44
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
VIII.	ANEXOS.....	53

RESUMEN

Cerca de la mitad de las tierras continentales del planeta se consideran zonas áridas o sufren amenaza de sequía. Dentro de las plantas adaptadas a estos ecosistemas se destacan los cactus. Para poder desarrollarse los cactus tienen varios mecanismos de adaptación, entre ellos la asociación con comunidades microbianas benéficas a nivel de su rizósfera. Dentro de estos microorganismos destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y los hongos micorrizicos arbusculares (HMA), quienes contribuyen al desarrollo exitoso de la planta en condiciones de aridez. *Opuntia ficus-indica* es la cactácea más estudiada actualmente. La identificación de los microorganismos asociados a la rizósfera de *O. ficus-indica* es importante para lograr entender en parte la adaptación de los cactus a estos climas extremos y podría ayudar a desarrollar proyectos de agricultura en el desierto. La identificación de las RPCV asociadas a la rizósfera de *O. ficus indica* de cinco zonas de Tumbes (Perú) ha sido basada en análisis de metagenómica dirigida al gen 16S del ADNr con el programa MG Rast, además mediante técnicas de microbiología e identificación molecular para bacterias cultivables, así mismo se ha identificado HMA mediante técnica de semi-nested PCR, por último la identificación de proteínas mediante técnica de espectrometría de masa MALDI TOF MS. Los resultados de metagenómica muestran una amplia diversidad bacteriana rizosférica con un total de hasta 683 especies de bacterias cultivables y no cultivables, así mismo ha sido posible aislar 48 bacterias, entre las cuales se encuentran principalmente *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Citrobacter*, por otro lado ha sido posible optimizar protocolo de extracción de ADN y programas de seminested PCR para la identificación de los géneros *Glomus* y *Gigaspora* de HMA, finalmente se logró identificar a proteínas de *O. ficus-indica* mediante la técnica de espectrometría de masa MALDI TOF TOF MS.

Palabras clave: Bacteria, rizósfera, Hoongos micorrizicos arbusculares *Opuntia ficus-indica*, suelos áridos, metagenómica, proteómica.

ABSTRACT

About half of the mainland of the world are considered arid lands or threatened suffer drought. Among the plants adapted to these ecosystems highlights the cactus. In order to develop the cactus has various coping mechanisms, including the association with beneficial microbial communities at the level of its rhizosphere. Within these organisms include the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and Arbuscular mycorrhizal Fungi (AMF) who contribute to the successful development of the plant in dry conditions. *Opuntia ficus-indica* is the cactus most currently studied. Identification of the bacteria associated with the rhizosphere of *O. ficus-indica* is important in order to understand in part the adaptation cacti these in extreme climates and could help develop agriculture projects in the desert. Identification of the bacteria associated with the rhizosphere of *O. ficus indica* five areas of Tumbes (Peru) has been based on analysis of metagenomic directed to 16S rDNA gene with MG Rast program, and using techniques of microbiology and molecular identification cultivable y bacteria, in addition it has been identified by HMA technique semi-nested PCR finally protein identification using mass spectrometric technique MALDI TOF MS. Metagenomics results show a wide rhizosphere bacterial diversity with a total of up to 683 species of cultivable and non-cultivable bacteria. Furthermore it has been possible to isolate 48 bacteria, among. On the other hand it has been possible to optimize protocol DNA extraction and PCR programs seminested for the identification of the genera *Glomus* and *Gigaspora* HMA, finally managed to identify proteins *O. ficus-indica* by the technique of MALDI mass spectrometry TOF TOF MS.

Keywords: Bacteria, rhizosphere, arbuscular mycorrhizal Fungi *Opuntia ficus-indica*, arid soils, metagenomics, proteomics.

I. INTRODUCCIÓN.

Las tierras secas incluyen una amplia gama de situaciones ambientales comprendiendo desde los desiertos extremos (hiperáridos) hasta los ecosistemas subhúmedos secos (MINAM, 2011). En términos científicos, el bioma de desierto puede definirse climatológicamente como la suma de todas las zonas áridas e hiperáridas del mundo, y físicamente como amplias zonas contiguas con grandes extensiones de suelo desnudo y escasa cobertura vegetal (UNEP, 2006). Cerca de la mitad de suelos cultivables son áridos, semiáridos o viven bajo amenaza de sequía (Aguirre *et al*, 2012).

En las zonas áridas las plantas han sufrido un proceso evolutivo profundo que resulta en una amplia variedad de formas de vida especializadas adaptadas para sobrevivir en estos medios. (UNEP, 2006, Aguirre, 2012). Las cactáceas (Cactaceae) corresponden a una de las familias de plantas adaptadas en suelos áridos y *Opuntia ficus-indica* es la especie más importante por ser un recurso de productos y usos múltiples, inicialmente como planta silvestre y después como cultivo de subsistencia comercial, contribuyendo así a la seguridad alimenticia de poblaciones en áreas agrícolas marginadas (Nobel, 2002; Reynolds, 2003; Alary *et al*, 2007).

Para lograr convertir los suelos áridos en tierras arables, se requiere de una visión global de todo el ecosistema y las interacciones planta-microorganismos (Marrasco *et al.*, 2012), La rizósfera es el hábitat ecológico en el cual los microorganismos están en contacto directo con la raíces de las plantas, donde existe un flujo de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis que son exudados por la raíz, además es el sitio donde se dan diversas interacciones benéficas, en el caso de los cactus para poder desarrollarse en condiciones áridas (Loredo *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2012)

Bajo todas estas perspectivas de desarrollo de la agricultura de desierto basada en cultivos de cactáceas nativas, nuestra investigación planteó la identificación de bacterias cultivables y no cultivables asociadas a la rizósfera de *O. ficus-indica*, mediante un enfoque microbiológico con caracterización molecular de las cepas aisladas y enfoque metagenómico para la microbiota global

II. ANTECEDENTES.

Rizósfera y microbiota

Muchos aspectos importantes de las interacciones suelo-planta son mediados por procesos a nivel de la rizósfera, incluyendo la adquisición de nutrimentos por la planta, la colonización de las raíces por los microorganismos y la descomposición de la materia orgánica (Gómez *et al.*, 2012). En virtud de su capacidad de adaptación fisiológica y versatilidad metabólica, las bacterias en las zonas de raíces de las plantas son agentes claves del cambio del suelo en los agroecosistemas, con efectos positivos, en cuanto a tolerancia a altos contenidos de sales, aumento en los rendimientos de los cultivos y mejoras en la calidad del suelo, respecto a la disponibilidad de nutrientes; sin embargo, esta regulación está mediada por el quórum sensing de las bacterias, las cuales, se deben adaptar para alcanzar una alta proliferación y, de esta manera, se estimulan, se activan y se mantienen en la zona radicular, por medio de la liberación selectiva de los exudados y lixiviados, por parte de las plantas y otros microorganismos (Cano, 2011). A su vez, las bacterias de la rizósfera son capaces de generar una amplia variedad de metabolitos secundarios, que pueden tener una influencia positiva, sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, mejoran la disponibilidad de minerales y nutrientes en el suelo, etc. (De-Bashan *et al.*, 2007).

Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV).

Dentro de los microorganismos presentes en la rizosfera destacan las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV), quienes ayudan al establecimiento exitoso en las zonas áridas, (Schoebitz, 2006). Los mecanismos de las RPCV para promover el crecimiento de las plantas son diversos, los que se mencionan con más frecuencia en la literatura son: fijación de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, incremento en el desarrollo de la raíz, producción de compuestos sideróforos que incrementan la disponibilidad del Fe en la rizósfera, alteraciones en el

potencial de la membrana de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos, adaptación al estrés hídrico e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo *et al.*, 2004).

Entre las principales RPCV se encuentran los miembros de la familia Enterobacteriaceae, mientras que otros están relacionados con los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Schoebitz, 2006). Las *Pseudomonas spp.* pueden ejercer un efecto benéfico directo, a través de la síntesis de fitohormonas y de vitaminas, estimulación de la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno, solubilización de fósforo inorgánico, de manera indirecta, por medio de síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por la inducción de la resistencia sistémica a patógenos, pueden también actuar como agentes de control biológico, capaces de proteger a las plantas de la infección, causadas por agentes fitopatógenos (Siddiqui y Shaukat, 2003 en Cano, 2011).

En el año 1997 se comunicó la presencia de *Azospirillum sp* en los géneros *Cenchrus*, *Atriplex*, *Opuntia*, *Simmondsia*, *Gossypium* y *Salvia chia*, plantas cultivadas en zonas áridas y semiáridas (Stegmayer *et al*, 1997 en Pernasetti y Di Barbaro, 2012). Así mismo Pernasetti y Di Barbaro (2012) ensayaron inoculando *Azospirillum brasilensis* en *Opuntia* (tuna) resultando en un aumento significativo de las raíces, característica de gran importancia para esta planta que se desarrolla en zonas de aridez, ya que amplía la posibilidad de toma de agua y nutrientes sin olvidar también la importancia que tiene el mayor desarrollo radical en el anclaje de la planta en zonas ventosas.

Desafortunadamente, sólo una pequeña proporción de los microorganismos de la rizosfera puede ser cultivable, lo que significa que nuestra comprensión del mundo microbiano es altamente sesgada y no representa la realidad en la naturaleza (Amann *et al.*, 1995; Pace, 1997; Neelakanta y Sultana, 2013; Handelsman, 2004). De hecho, casi todos los microorganismos viven en comunidades de especies múltiples donde interactúan y se benefician de la cooperación microbiana. Los cultivos microbianos clonales *in vitro* no permiten una representación verdadera de las comunidades microbianas, lo que hace importante obtener información genética de las comunidades microbianas directamente a genomas extraídos de sus de sus hábitats naturales. Los primeros estudios en este mundo desconocido se centraron en el gen 16S ribosomal RNA (rRNA) (Muyser *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998), considerando en particular las regiones hipervariables (V1-V9) que permite la discriminación de la diversidad bacteriana en muestras del medio ambiente (Shah *et al.*, 2011).

Hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA)

Los Hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA) son microorganismos rizosféricos simbióticos. Como en otras relaciones simbióticas, ambos participantes obtienen beneficios. En este caso la planta recibe de los hongos principalmente nutrientes, minerales y agua, y el hongo obtiene de la planta hidratos de carbono y vitaminas que él por sí mismo es incapaz de sintetizar mientras que ella lo puede hacer gracias a la fotosíntesis y otras reacciones internas. (Smith y Read, 1997). Los resultados de la simbiosis son modificaciones en la organización de células vegetales y fúngicas causadas por cambios específicos en la expresión génica. Se estima que entre el 90 y el 95% de las plantas terrestres presentan micorrizas de forma habitual. (Smith y Read, 1997).

El uso de HMA en la agricultura tiene un gran potencial biotecnológico debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, además de ser estos microsimbiontes, componentes inseparables de los agroecosistemas,

realizan diversas funciones en su asociación con las plantas, pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales (Thompson, 1991). Entonces el uso de estos hongos, permite que se incremente la adaptación y que la fertilización sea más eficiente, es por ello que en el caso de los cultivos se podría ahorrar cantidades importantes de fertilizantes minerales e igualmente lograr una absorción de los nutrientes disponibles en el suelo (Prieto *et al.*, 2012). Por lo tanto, las plantas micorrizadas poseen una ventaja importante con respecto a las no micorrizadas (Klironomos, 2003).

El efecto benéfico de los HMA (definido como efectividad) en la promoción del crecimiento y/o nutrición de las plantas parece estar definido por la riqueza de aspectos ecológicos de donde fueron recolectados los HMA. Aun cuando no son específicos, los HMA pueden presentar mayor compatibilidad hacia algunas especies vegetales (Van der Heijden *et al.* 1998). Así, algunos HMA pueden estimular el crecimiento, y otros pueden favorecer la absorción de nutrientes, inducir resistencia a fitopatógenos, o ayudar en la adaptación y tolerancia de las plantas ante condiciones de estrés (Aguilera-Gómez *et al.*, 1999, Hodge *et al.*, 2000).

En sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano, el aislamiento de HMA los géneros encontrados fueron los siguientes: *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* y *Scutellospora*. En todos los sitios muestreados el género con mayor representatividad en cantidad de esporas encontradas por gramo de suelo fue *Glomus*, mientras que para *Gigaspora* hubo la menor cantidad de esporas (Prieto *et al.*, 2012).

Tecnologías next generation secuensing (NGS)

Con la aparición de las tecnologías next generation secuensing (NGS), se llevaron a cabo proyectos de secuenciación masiva de las comunidades

bacterianas (Venter *et al.*, 2004; Tringe *et al.*, 2005; Hamady *et al.*, 2008). Esta metodología, denominada metagenómica, permite la secuenciación de toda la comunidad. La producción de grandes volúmenes de datos de secuencias nucleotídicas, en magnitudes pueden alcanzar terabytes (TB) de información para una muestra de suelo (Gans, 2005).

Tres categorías principales han sido utilizadas para la identificación y clasificación de las secuencias: búsqueda de similitudes de secuencias, composición de la secuencia y métodos filogenéticos (Bazinnet y Cummings, 2012). Un gran número de aplicaciones de software han sido lanzados (Gerlach y Stoye, 2011; Schreiber *et al.*, 2010) y la mayoría de ellos utilizan sólo uno de los enfoques, a pesar de algunas excepciones en las que se utilizan dos métodos simultáneamente.

Este enfoque se basa en la información obtenida por homología en búsquedas de bases de datos. La selección del taxón es una estrategia relativa más básica para buscar el mejor éxito en la base de datos, pero este tipo de clasificación ha de interpretarse con cuidado, ya que la distancia evolutiva entre el Fragmento de ADN y el éxito es desconocido (Gerlach y Stoye, 2011). Sin embargo, esta clasificación es fiable sobre los niveles taxonómicos superiores (por ejemplo súper reino o filo). CARMA (Gerlach y Stoye, 2011), MARTA (Horton *et al.*, 2010), MetaPhyler (Liu *et al.*, 2011), MetaPhlAn (Segata *et al.*, 2012) o MG-RAST (Glass *et al.*, 2010) son algunas herramientas basados en búsquedas de similitud y cada uno de ellos tiene características complementarias para mejorar la clasificación.

Espectrometría de masas MALDI TOF TOF

La espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) se

ha introducido recientemente en laboratorios de investigación como una tecnología emergente aplicada para la identificación de organismos basada en el análisis espectral de proteínas (Seng *et al.*, 2009), esta se realiza por comparación del espectro del microorganismo investigado con espectros en una base de datos de referencia que permite la identificación rápida de bacterias, animales y plantas. (Lay, 2001).

MALDI-TOF MS es una herramienta útil para la caracterización de microorganismos que son difíciles de identificar utilizando métodos de rutina. así varios estudios han reportado el uso de MALDI -TOF MS para la identificación de plantas(Sandrin *et al.*, 2013). Por todo ello el uso de MALDI-TOF podría ser una herramienta potencial para la identificación más rápida, más precisa y menos costosa de proteínas de plantas (Seng *et al.*, 2009, Sala *et al.*, 2016

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

Área de estudio, plantas de Cactus y muestreo.

Tumbes es un departamento situado en el extremo noroeste de Perú, se caracteriza por poseer una alta temperatura y humedad relativa durante todo el año, siendo la temperatura promedio de 26 °C, así mismo el promedio de precipitación anual es de 464.1 mm y ocurren durante los meses de diciembre a abril (SENAMHI, 2015).

La selección de cada *O. ficus-indica* fue en función a su desarrollo normal como planta cultivada y/o silvestre en las zonas áridas de del departamento de Tumbes, en las zonas conocidas como Corrales, Cabuyal, Casitas, Uña de Gato y Puerto Pizarro (Figura 1).

El muestreo se realizó tomando aproximadamente 2 kg de muestra de rizósfera de *O. ficus-indica*, seleccionadas por juicio no probabilístico o de conveniencia debido a que las plantas se encontraban en pequeñas cantidades y en estado silvestre, se consideró como juicio crítico la vigorosidad de la planta y el tamaño, el material de colecta empleado se desinfectó con alcohol cada vez que se cambió de planta, las muestras fueron colocadas por separado en bolsas plásticas tipo ziploc, siendo trasladadas al laboratorio y puestas en refrigeración de 4°C hasta su uso.



Figura 1. Localización de las zonas de muestreo de rizosfera de *Opuntia ficus-indica*

Determinación físico-químico del suelo

Luego de la recolección de las muestras se pesó 1 kg de suelo para determinar la textura, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio. Esta determinación fue realizada en el Laboratorio de Agua, Suelo, Medio Ambiente y Fertilización de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional Agraria La Molina, quienes proporcionaron los resultados para el análisis correspondiente.

Aislamiento y purificación de bacterias cultivables

Se realizó utilizando la técnica de diluciones, la cual consistió en adicionar 2 g de muestra en 18 ml de caldo de cultivo Trypticase Soy Broth (TSB) y Luria Bertani (LB), se colocó en shaker orbital por 12 horas para luego tomar 10 µl de cada solución y ser sembrada por aspersión en diferentes placas Petri conteniendo, por separado, medio de cultivo Trypticase Soy Agar (TSA) y Cetrimide, donde el primero es un medio de cultivo general y el segundo es un medio específico para *Pseudomonas*.

Posteriormente se purificaron las bacterias haciendo repliques hasta obtener cepas putativas; estas placas fueron usadas para seleccionar las colonias bacterianas basadas en su diferencia morfológica. Las colonias seleccionadas fueron mantenidas en el mismo medio de crecimiento de donde fueron obtenidas, para luego mediante la técnica de tinción diferencial Gram fueron observadas al microscopio.

Extracción de ADN de bacterias cultivables

Se utilizó el método de extracción rápida de ebullición por Buffer Fosfato Alcalino (PBS). Las unidades formadoras de colonia (UFC) “puras putativas” se colocaron en microtubos con TSB o LB y luego fueron microcentrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se conservó solo el pellet. Para la lisis celular se agregó Tris HCl - Edta (1x) y se colocaron los tubos a ebullición por 10 minutos, seguido a esto se procedió a incubar los tubos en hielo por 5 minutos. Este shock de temperatura junto con los reactivos antes mencionados ayudó a la rotura de las membranas celulares de las bacterias. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos y se retiró todo el sobrenadante posible, sin tocar el pellet; este fue resuspendido en agua ultrapura y se adicionó ARNasa para luego ser puesto en incubadora a 37°C por una hora.

Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para bacterias.

Para realizar la PCR, se preparó un buffer mix, el cual contenía Buffer 10x,, Agua Ultra Pura (AUP), dNTPs, Taq Polimerasa recombinante y Primers del gen gen 16S rRNA Forward y Reverse. Se adicionó 23 µl del mix en microtubos junto con 2 µl del ADN obtenido por extracción y fueron colocados en el termociclador con el programa establecido para los genes 16S: 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y 72°C por 4 minutos.

Electroforesis y secuenciación

Se preparó gel de agarosa al 1.5%, para ello se pesó 0.9 g de Agarosa y se resuspendió en 60 ml de Tris Ac. Acético EDTA, se adicionó 3 µl de bromuro de etidio y se vertió sobre una cubeta de 20 pocillos, en cada pocillo se colocó la mezcla de azul de bromofenol con los amplicones obtenido por PCR, cada uno por separado. Posteriormente fue colocada en una cámara de electroforesis y se dejó migrar las muestras por 30 minutos a 90 voltios, después de ello el gel fue colocado en un transiluminador UV donde se observaron bandas fluorescentes a una misma distancia. Las muestras positivas fueron enviadas a los laboratorios de la empresa Macrogen (USA), quienes remitieron los resultados para el alineamiento correspondiente.

Aislamiento de esporas de HMA.

Se utilizó el método de tamizado (Gerderman y Nicholson, 1963). La cual consistió en pesar 10 g de suelo y se mezcló con 100 ml de agua en un matraz, se agitó durante 15 minutos, seguidamente se dejó reposar por 30 segundos, para que las esporas queden suspendidas, luego se pasó a través de tamices de 500, 212, 106 y 38 µm. El material que quedó atrapado en los diferentes tamices, se recogió y se vertió en un tubo falcón cada uno con una pequeña cantidad de agua de manera que de una cantidad de 15 ml, se llevó a centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante. Luego se le adicionaron 15 ml de la solución de sacarosa al 80%. Se equilibraron los tubos y se llevó a centrifugar durante 2 minutos a 2000 rpm. Se sacó cuidadosamente los tubos de la centrifuga, cuidando de no romper la interface agua – sacarosa. Se vertió toda la superficie de la interface y un poco de esta para recoger las esporas que no atravesaron la solución, en un embudo Buchner al cual se colocó un papel filtro y se complementó con una bomba de vacío, para que toda la materia que este flotando en la superficie del agua pase al papel filtro. Luego el papel filtro con los sedimentos después del filtrado se colocaron en placas petri y se observaron al estereoscopio o microscopio.

Extracción de ADN metagenómico de bacterias cultivables y no cultivables

La extracción de ADN metagenómico de bacterias cultivables y no cultivables se realizó empleando el Kit Power® Soil DNA Isolation y se procedió según el protocolo descrito por el laboratorio MO BIO. El ADN producto de esta extracción fue cuantificado en un espectrofotómetro marca Eppendorf y luego llevado a reacción en cadena de la Polimersa (PCR) con primers 16S rRNA Forward y Reverse para su confirmación en electroforesis en gel de agarosa. Las muestras positivas se fueron enviadas a la compañía biotecnológica Dr. DNA (México) quienes remitieron los resultados su posterior análisis.

Análisis de Datos

Los resultados de las secuencias de nucleótidos del gen 16S rRNA se alinearon empleando el programa Mega 6 y se analizaron utilizando el BLAST de NCBI. Por otro lado los OTU (Operational Taxonomic Unit) obtenidos por metagenómica fueron analizados mediante el programa bioinformático MG – RAST. Finalmente los datos obtenidos de MALDI TOF fueron analizadas con el software protein pilot 4.0 con bases de datos específicas para cada microorganismo y se procedió a corroborar la secuencia de aminoácidos para cada proteína usando el programa bioinformática protein blast

Pruebas de antagonismo bacteriano intra-genero

Estas pruebas se realizaron correspondientes a tres generos de bacterias :Pseudomonas, Enterobacter y Acinetobacter, para ello se utilizó Agar Cetrimide para hacer cultivo de Pseudomonas y Agar TSA para Enterobacter y Acinetobacter, se agregó 100 ul. de las bacterias mencionadas en una placa petri, luego del sembrado se colocó papel filtro estéril inoculando 5ul. de la bacteria a hacer antagonismo y se procedió a observar halos de inhibición a partir de las 24 horas en adelante.

Aislamiento de esporas de HMA.

Se utilizó el método de tamizado (Gerderman y Nicholson, 1963). La cual consistió en pesar 10 g de suelo y se mezcló con 100 ml de agua en un matraz, se agitó durante 15 minutos, seguidamente se dejó reposar por 30 segundos, para que las esporas queden suspendidas, luego se pasó a través de tamices de 500, 212, 106 y 38 μm . El material que quedó atrapado en los diferentes tamices, se recogió y se vertió en un tubo falcón cada uno con una pequeña cantidad de agua de manera que de una cantidad de 15 ml, se llevó a centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante. Luego se le adicionaron 15 ml de la solución de sacarosa al 80%. Se equilibraron los tubos y se llevó a centrifugar durante 2 minutos a 2000 rpm. Se sacó cuidadosamente los tubos de la centrifuga, cuidando de no romper la interface agua – sacarosa. Se vertió toda la superficie de la interface y un poco de esta para recoger las esporas que no atravesaron la solución, en un embudo Buchner al cual se colocó un papel filtro y se complementó con una bomba de vacío, para que toda la materia que este flotando en la superficie del agua pase al papel filtro. Luego el papel filtro con los sedimentos después del filtrado se colocaron en placas petri y se observaron al estereoscopio o microscopio.

Cultivos Trampa

Se utilizó como planta trampa a la alfalfa (Ferrera et al, 1993). Se esterilizó el suelo, luego se desinfectó la maceta y se le llenó hasta las tres cuartas partes de su capacidad total, seguidamente se colocó una capa homogénea del inóculo del HMA (papel filtro conteniendo esporas) y se llenó hasta su capacidad total con suelo estéril. Se procedió a la siembra con semillas desinfectadas de alfalfa y se le mantuvo bajo condiciones favorables por un periodo de 3 meses (Fig. 2).



Figura 2. Cultivos trampa de *Medicago sativa* “alfafa” de las 5 zonas de muestreo.

Tinción de raíces colonizadas de HMA.

Se realizó la tinción con el colorante azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970), la cual consistió en los siguientes pasos:

Clareo: Las raíces libres de suelo se colocaron en tubos estériles, se agregó suficiente KOH al 10 % para cubrir las raíces. Se procedió a calentar por 10 minutos.

Blanqueo: Se retiró el KOH y los tubos con las raíces se enjuagaron con agua destilada. Se agregó H₂O₂ al 10% en suficiente cantidad para que cubra las raíces durante tres minutos, pasado este tiempo se procedió a enjuagar con agua destilada.

Acidificación: las raíces se cubrieron con HCL al 10% por tres minutos, se eliminó el ácido y sin enjuagar se procedió a la tinción.

Tinción: los tubos que contienen las raíces se cubrió con la solución colorante (azul tripano 0.05% en lactoglicerol) y se calentó por 10 minutos.

Decoloración: el colorante se eliminó y se decoloró las raíces con lactoglicerol.

Extracción de ADN de HMA

Se trituró las raíces en un mortero con nitrógeno líquido, se traspasó aproximadamente 0.1gr de lo triturado a un microtubo de 1.5ml y con la ayuda de los maceradores se siguió triturando, se le agregó 600µl del Buffer de Extracción CTAB 2X (pre-calentado a 60°C) para luego seguir macerando y luego se homogenizó en el vortex. Se llevó a Incubar a 60°C por 60 minutos (Homogenizó cada 15-20 minutos durante el tiempo de incubación). Se le adicionó 300µl de Fenol Buferiado y 300µl de Cloroformo/Alcohol isoamilico (24:1) (Homogenizar invirtiendo los microtubos), se llevó a Centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante a un nuevo microtubo. Se le volvió agregar un volumen igual de Cloroformo/Alcohol isoamilico (24:1) (Homogenizar invirtiendo los microtubos), se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante a un nuevo microtubo. Se le agregó 0.6 volumen de Isopropanol helado (Homogenizar invirtiendo los microtubos) y se llevó a incubar -20°C por 30-60 minutos. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 µl de etanol al 75%, se homogenizó en el vortex. Por último se llevó a Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante completamente y se centrifugó a 12 000 rpm por 1 minuto, se sacó los restos de sobrenadante. Se dejó secar 15 minutos el pellet a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 30 µl de T.E (precalentado a 60 °C). Se le agregó 1 µl de ARNasa y se incubó a 65 °C por 15 minutos.

Semi-nested PCR para HMA

Se preparó un buffer mix, el cual consistió en agregar en un tubo eppendorf los siguientes reactivos: Buffer 10x, MgCl₂, AUP (Agua Ultra Pura), Dntps, Taq. Polimerasa recombinante, Primers Forward y Reverse, luego se agregó 23 µl del buffer mix y 2 µl de la muestra en microtubos, seguidamente fueron puestos en un termociclador con el programa establecido. Para HMA se usaron primers

externos (NS5+ITS4) y específicos (NS5+GLOM5.8R; ITS4+GLOM1310; NS5+GIGA5.8R) (Fig. 3.).

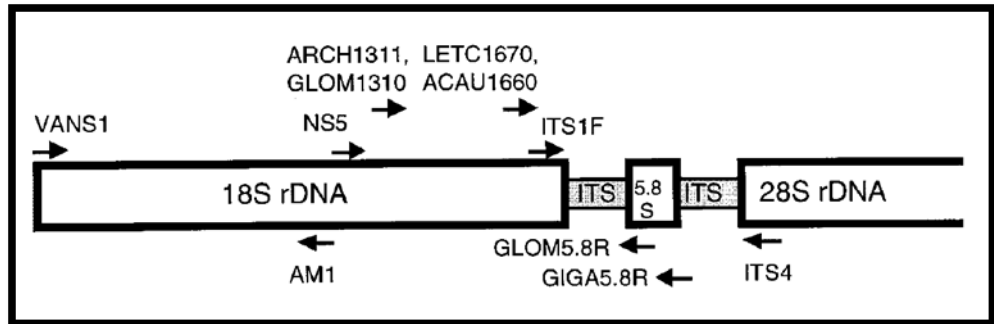


Figura 3. Representación esquemática de genes de ARN ribosómico con sitios de hibridación de primers (Redecker, 2000).

Electroforesis en gel de agarose para HMA

Para la preparación del gel se pesó la agarosa en polvo la cantidad necesaria y se le mezcló con el tampón TAE 1X en un matraz de Erlenmeyer, Se calentó la mezcla en la cocina hasta que se disolvió la agarosa, se dejó enfriar la mezcla y se agregó bromuro de etidio, se mezcló bien y se vertió la solución en el molde, se dejó que se forme el gel. Una vez completamente formado el gel, se retiró cuidadosamente el peine y se colocó el gel en la cubeta de electroforesis. Se procedió a cargar 10 µl de cada muestra en pocillos consecutivos luego se cerró la tapa de la cubeta del gel y se conectó los cables eléctricos para que el ADN migre hacia el ánodo. Por último se llevó el gel en un transiluminador UV y se observó.

Extracción de Proteínas de Cactus

Para la extracción de proteínas del cladodio de *O.ficus-indica* se utilizó el protocolo desarrollado por Balen, 2007, el producto de la extracción se separó por SDS PAGE 10 %, Luego la digestión en gel se realizó utilizando el protocolo de Shevchenko et al 2006, que nos permitió la digestión eficiente de proteínas fijadas en gel de poliacrilamida. Finalmente se realizó análisis por

espectrometría de masas MS MALDI TOF- TOF obteniendo mapeos de masas de alto rendimiento.

Micropropagación in vitro *Opuntia ficus-indica* var. *inermis* en condiciones de laboratorio.

Extracción y siembra de explantes.

Las pencas fueron lavadas en el Laboratorio en el área de lavado y preparación de medios de cultivo para retirar los restos de tierra adherida, para después proceder a la disección de las pencas hasta una longitud de 3 cm por 3 cm, luego estas secciones fueron llevadas al ambiente de siembra dentro de agua destilada, donde dentro de la cámara de siembra previamente desinfectada se colocaron estas, para proceder a la desinfección del material vegetal; realizándose primeramente una desinfección con alcohol al 70 por ciento por espacio de un minuto y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril, para después proceder a la segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 5 por ciento por espacio de 14 minutos y de igual forma después se procedió a enjuagar con agua destilada estéril por cinco veces, para finalmente obtener porciones de aproximadamente de 2cm por 2cm, las cuales fueron sembradas.

Establecimiento o introducción

Las secciones que contenían una a dos areolas y que se obtuvieron haciendo uso de bisturí y de pinzas, que no se habían contaminado después de cuatro días de ser evaluadas; permanecieron en el medio de establecimiento por espacio de 15 días, cuyos brotes se extrajeron a los 15 días con una altura aproximada de 1 cm para ser sembrados nuevamente en el medio antes mencionado para permanecer 30 días más hasta alcanzar una altura aproximada de 2 cm para ser luego llevados a la multiplicación *in vitro*.

Multiplicación *in vitro*

Los brotes de la fase anterior fueron colocados en el medio de multiplicación en donde permanecieron 35 días, donde en cada frasco se obtenían múltiples brotes de acuerdo al medio de cultivos establecido para esta fase.

Enraizamiento *in vitro*

El total de brotes obtenidos en la fase anterior, se seccionaron aquellos que habían alcanzado una altura de 2 cm, los cuales estaban aptos para la fase de enraizamiento, para después observar la aparición de raíces, cada uno de los brotes en esta fase deberían alcanzar el tamaño de aproximadamente 10cm para estar aptos para la etapa siguiente de aclimatación de plántulas.

Plantas *in vitro* de *Opuntia ficus indica* var. inermes aptas para su aclimatación

Las plántulas de *Opuntia ficus indica* var. Inermes que se encontraban en fase de enraizamiento fueron llevadas a la siguiente fase de aclimatación, siendo estas sacadas de los tubos de ensayo y para después colocarlas en el sustrato correspondiente para su posterior inoculación.

Aclimatación de las plántulas

Las plántulas recién enraizadas son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En el momento en que se extraen las plántulas enraizadas de los frascos, están poco adaptados a crecer en un medio ambiente natural, ya que estos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad y temperatura controlada. Las plántulas enraizadas, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero aumentando progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estas plántulas se plantarán en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa, en este caso utilizaremos SUSTRATO PREMIX #8; que es caracterizado por ser una mezcla

uniforme, inocua, no requiere desinfección alguna antes de su uso, este es ideal para la producción de plantines en macetas, su presencia de perlita y vermiculita lo hace útil para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, las plántulas se enjuagan y se colocan en almacigueras con el sustrato seleccionado y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato. Al comienzo las plantas se dejaron media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejarán destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia.

IV. RESULTADOS.

Determinación físico química de los suelos

La determinación físico química de los suelos ha incluido la textura, pH, materia orgánica, nitrógeno, fosforo y potasio de cada punto de muestreo (Tabla 1).

Tabla N°1. Parámetros físico – químicos considerados en el análisis de las muestras de suelo de los diferentes puntos de muestreo.

Lugar de muestreo	Textura	pH relación 1:1	M.O. (%)	N (%)	P ppm	K ppm
Corrales	Arena franca	8.18	1.79	0.08	44.36	268.00
Cabuyal	Arena franca	8.37	1.30	0.06	39.95	190.80
Casitas	Franco Limoso	6.73	1.61	0.08	46.53	1,628.00
Uña de Gato	Franco Arenoso	8.13	0.71	0.04	32.05	137.60
Puerto Pizarro	Franco Arenoso	7.74	3.82	0.16	25.38	228.00

Aislamiento e identificación molecular de bacterias aisladas de la rizósfera de de *Opuntia ficus- indica* de suelos áridos

Una colección de 198 cepas de bacterias nativas cultivables aisladas en la rizósfera de *O. ficus-indica* en los diferentes puntos de muestreo ha sido identificada en base de las secuencias de los amplicones con análisis subsecuente por Blast (Altschul *et al.*, 1997) frente a los datos del NCB,I recogiendo la extensión del segmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con un mayor grado de identidad de secuencia. Así, las 198 cepas aisladas han sido clasificadas en 48 especies y 16 generos que son en mayoría de *Enterobacter* (87 cepas aisladas), *Pseudomonas* (46 cepas aisladas) y *Klebsiella* (23 cepas aisladas) (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de bacterias nativas cultivables presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus- indica* de suelos áridos de Tumbes. (CO) Distrito de Corrales, (CA) Distrito de Cabuyal, (CT) Distrito de Casitas, Distrito de Uña de Gato (UC), Distrito de Puerto Pizarro (PP).

N	Nombre Científico	Lugar de muestreo	Número de cepas encontradas
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CO, CT	2
2	<i>Acinetobacter junii</i>	CO	1
3	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	CO	1
4	<i>Acinetobacter pittii</i>	CT	1
5	<i>Acinetobacter sp.</i>	CT, UC	8
6	<i>Aeromonas punctate</i>	CA	2
7	<i>Bacillus cereus</i>	CO, PP	2
8	<i>Bacillus megaterium</i>	CO	1
9	<i>Bacillus sp.</i>	CA	1
10	<i>Bacterium str. 61610</i>	CT	1
11	<i>Citrobacter freundii</i>	CA	1
12	<i>Citrobacter murlinae</i>	CA	1
13	<i>Endophytic bacterium</i>	CA	5
14	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CT,PP	34
15	<i>Enterobacter asburiae</i>	CO, PP	2
16	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	CO	3
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	CA, PP	18
18	<i>Enterobacter cloacae subsp. Cloacae</i>	CA	3
19	<i>Enterobacter hormaechei</i>	CT	3
20	<i>Enterobacter ludwigii</i>	CA	3
21	<i>Enterobacter sp.</i>	CA, CT	19
22	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	CO	2
23	<i>Escherichia hermannii</i>	CO	2
24	<i>Klebsiella pneumonia</i>	CA, CT, UC, PP	16
25	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>	PP	1
26	<i>Klebsiella sp.</i>	CA, PP	3
27	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CT	1
28	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	PP	1
29	<i>Klebsiella variicola</i>	CA	1
30	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CO	1
31	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	CO	2
32	<i>Lysinibacillus macrolides</i>	UC	1
33	<i>Lysinibacillus sp.</i>	UC	1
34	<i>Pantoea agglomerans</i>	CA	1
35	<i>Pantoea sp</i>	CA	1
36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CT	4
37	<i>Pseudomonas guariconensis</i>	CT	1
38	<i>Pseudomonas mendocina</i>	CA	1
39	<i>Pseudomonas monteilii</i>	CT, CO	5
40	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	CA, CT	11
41	<i>Pseudomonas putida</i>	CA, CO, CT	7
42	<i>Pseudomonas sp.</i>	CA, CT, UC	17
43	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i>	CO	1
44	<i>Serratia marcescens</i>	CO	1
45	<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	CO	1
46	<i>Staphylococcus sciuri</i>	CA	1
47	<i>Staphylococcus warneri</i>	UC	1
48	<i>Vibrio sp.</i>	PP	1

Análisis de las microbiotas de rizosfera por metagenómica dirigida al gen 16S rRNA

Mediante análisis por metagenómica dirigida al gen 16S rRNA se ha podido identificar las bacterias nativas presentes en la rizósfera de *O. ficus-indica* en suelos áridos de Tumbes, Perú, tal así que se han logrado identificar un total de 59 familias que incluye 90 géneros y 176 especies para Corrales; 89 familias con 161 géneros y 303 especies para Cabuyal; 127 familias que incluye 276 géneros y 683 especies para el distrito de Casitas; 104 familias con 191 géneros y 429 especies para Uña de Gato; 99 familias con 193 géneros y 452 especies para el distrito de Puerto Pizarro.

Los resultados analizados por el programa MG - RAST permitieron identificar los dominios: bacteria, arquea, eucariota, así como también dominios no asignados y secuencias no clasificadas (Figura 4). En el distrito de Casitas se obtuvo 86.63% del dominio bacteria, en Puerto Pizarro un 87.03%, en Uña de Gato 84.72%, en Cabuyal 80.44% y en Corrales 82.06%.

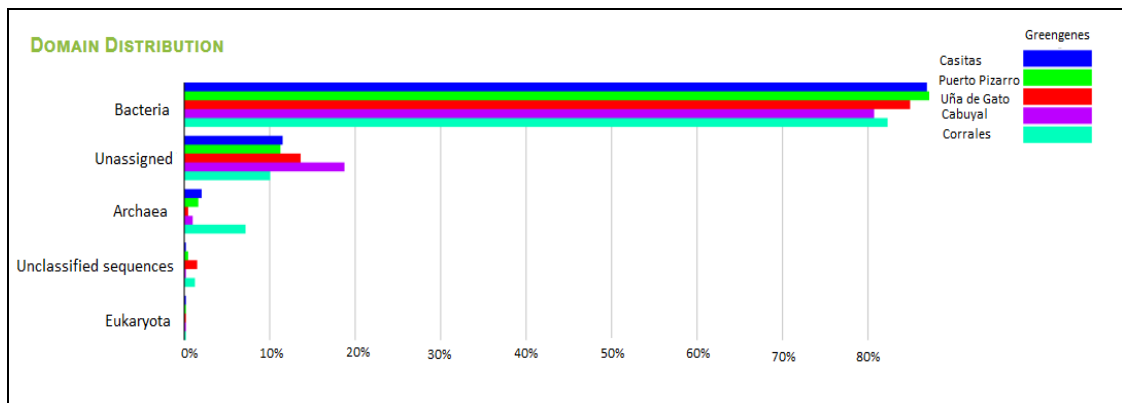


Figura 4. Distribución de los dominios presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* mediante metagenómica y analizados por MG-RAST

Así mismo se identificó que dentro de la distribución del dominio bacteria se encuentran los phylum Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Acidobacteria, Nitrospirae y Cyanobacteria, y en un menor porcentaje a los phylum Planctomycetes, Chlamydiae, Aquificae, Deinococcus – Thermus, Fusobacteria y Spirochaetes (Figura 5). Dentro de las muestras procedentes de Cabuyal se identificó un mayor porcentaje de 28.97% de Proteobacterias, y un menor porcentaje de 14.77% en las muestras provenientes de Corrales; así mismo se identificó 29.65% de Actinobacterias en las muestras de Corrales y un menor porcentaje en las muestras de 6.31% en las muestras de Cabuyal, el phylum Firmicutes estuvo presente en un 12.90% en las muestras de Casitas y un menor porcentaje de 2.15% en las muestras de Cabuyal.

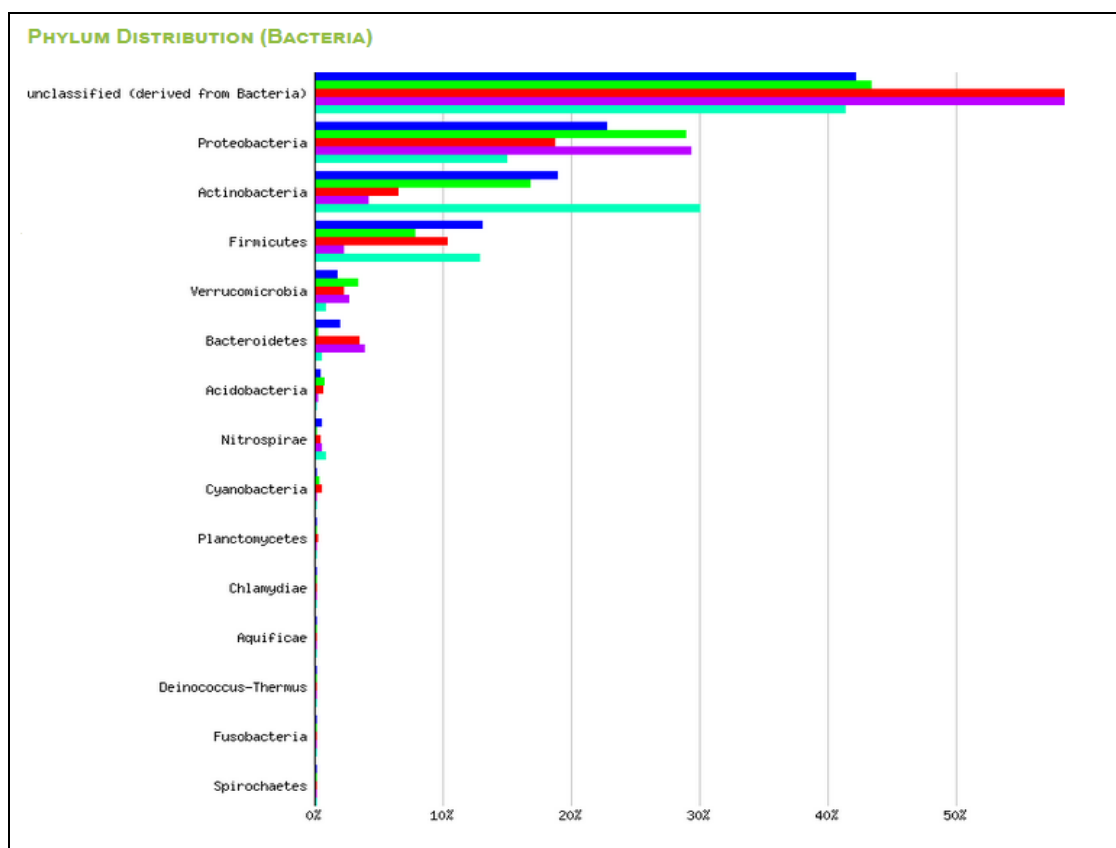


Figura 5. Distribución del Phylum bacteria presente en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* identificados por metagenómica empleando el programa MG – RAST.

La Figura 6 muestra la clasificación taxonómica y funcional de las secuencias leídas en las muestras de la rizósfera de *O. ficus-indica* obtenido a través del MG – RAST. Cada cuadro representa a los órdenes de bacterias presentes en los 5 puntos de muestreo, los cuales están agrupados por colores pertenecientes a una misma clase.

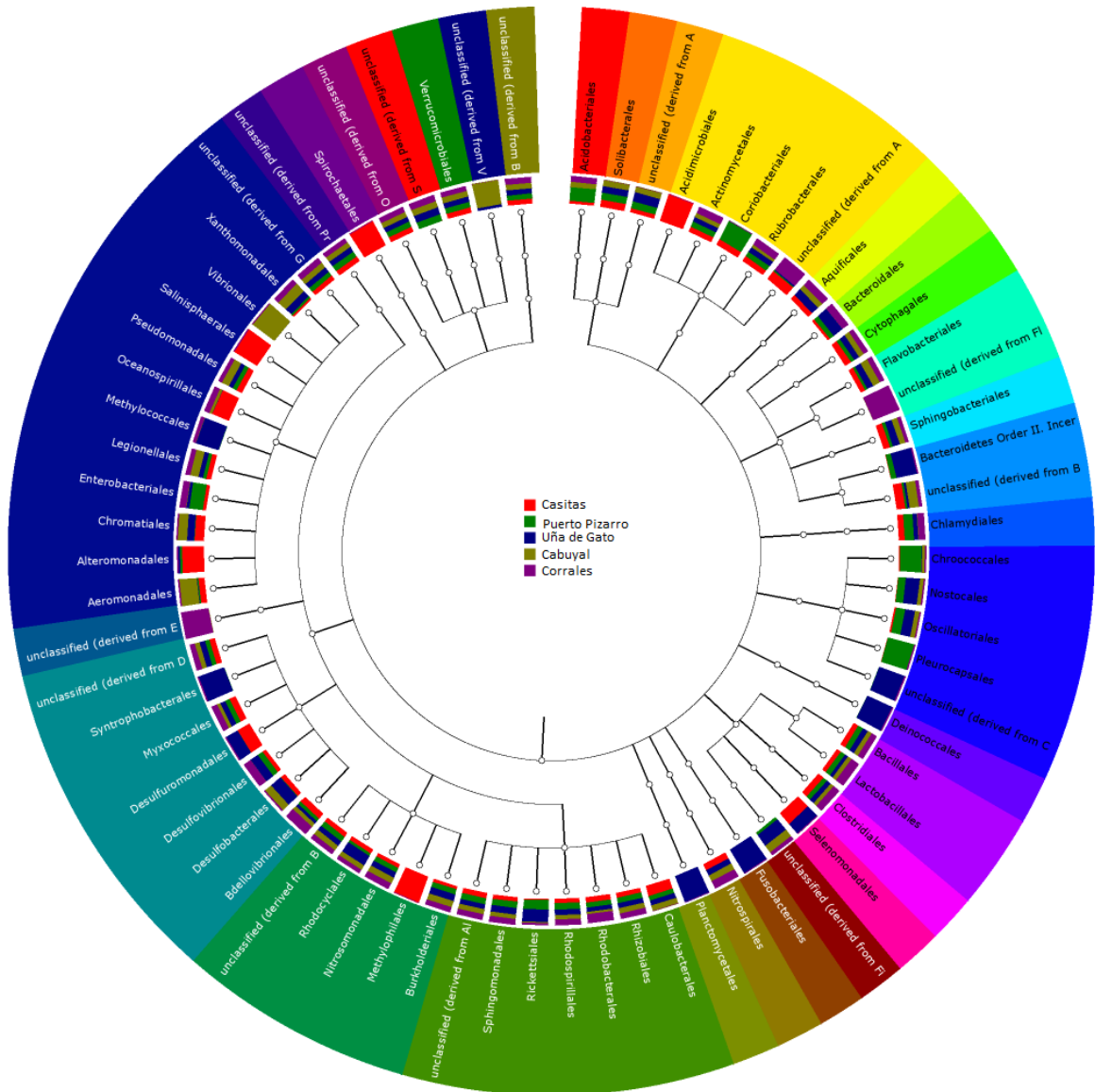


Figura 6. Diversidad bacteriana a nivel de orden en la rizósfera de *O. ficus-indica* mediante metagenómica dirigida al gen ADNr 16S, correspondiente a los distritos de Uña de gato, Puerto Pizarro, Casitas, Corrales y Cabuyal. El análisis se realizó utilizando el programa Mega Rast.

En la Figura 7 se observa la curva de rarefacción la cual muestra la riqueza de especies de los cinco puntos de muestreo, la misma que indica el número de especies en relación al número de lecturas realizadas. Así mismo esta figura revela la biodiversidad alfa presente en las muestras analizadas.

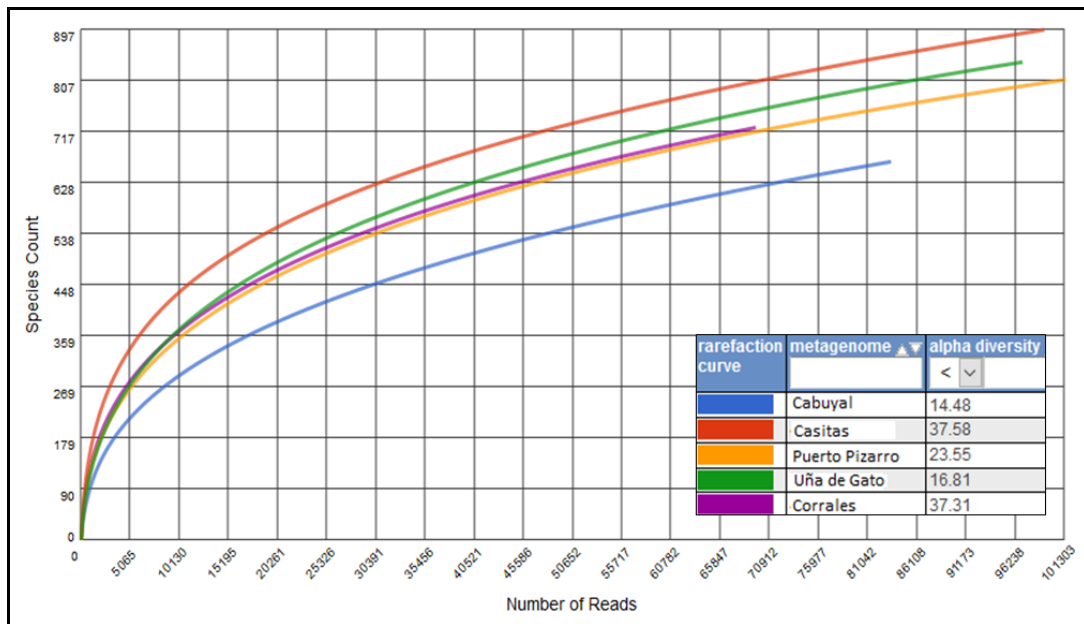


Figura 7. Curva de rarefacción y diversidad alfa de los cinco puntos de muestreo de la rizósfera de *Opuntia ficus-indica*. Se utilizó el programa MG – RAST.

Antagonismo bacteriano intra-genérico

En los resultados muestran que se logró obtener tres consorcios mono-genérico correspondientes a tres géneros bacterianos, siendo estos consorcios establecidos en base de los ensayos de antagonismo intra-genérico para evitar el uso de cepas no compatibles en cultivo.

El consorcio correspondiente al género *Enterobacter* está compuesto de cepas identificadas como *E. asburiae*, *E. xianfrangensis*, *E. cloacae*, *E. cloacae sub. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. hormaechei*,

El consorcio correspondiente al género *Pseudomonas* está compuesto de cepas identificadas como *P. mosseli.*, *Pseudomonas sp.* y *P. putida*.

El consorcio correspondiente al género *Acinetobacter* está compuesto de cepas identificadas como *A. junii*, *A. iwofii*, *Acinetobacter sp.1*, *A.pitti*, y *A. baumannii*.

Estos consorcios serán evaluados ulteriormente como inóculos bacterianos para favorecer el desarrollo de cactus.

Hongos micorrizicos arbusculares (HMA)

En la figura 8 se aisló esporas de HMA por el método de tamizado (Gerderman y Nicholson, 1963) de la rizósfera de *O. ficus-indica* en las 5 zonas de muestreo, dichas esporas se observaron en microscopio óptico (Olympus, Perú) a 100 X aumentos.

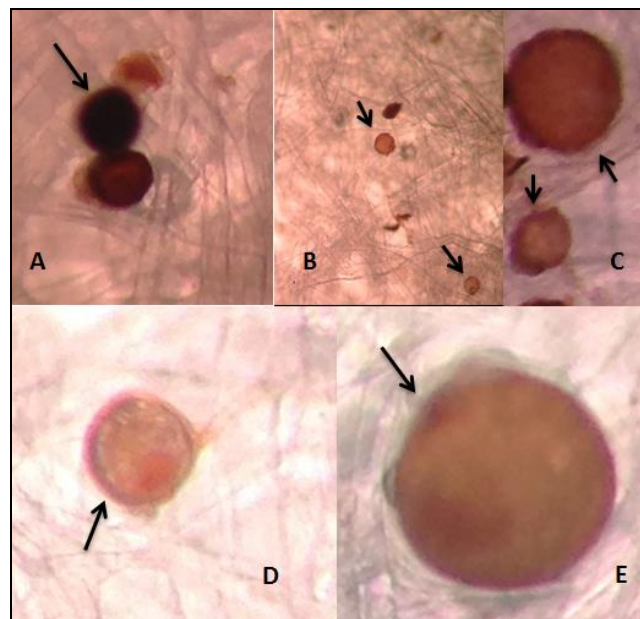


Figura 8. Esporas aisladas de HMA mediante el método del tamizado en la rizósfera *O. ficus-indica* de: A) Casitas. B) Cabuyal. C) Corrales. D) Puerto Pizarro. E) Uña de Gato.

La figura 9, muestra esporas teñidas de HMA luego de realizar la tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970) a las raíces de los cultivos trampa de *Medicago sativa* “alfalfa” en cada una de la zona de muestreo. Esta evaluación visual permitió conocer el estado de colonización de la planta (Redecker, 2000).

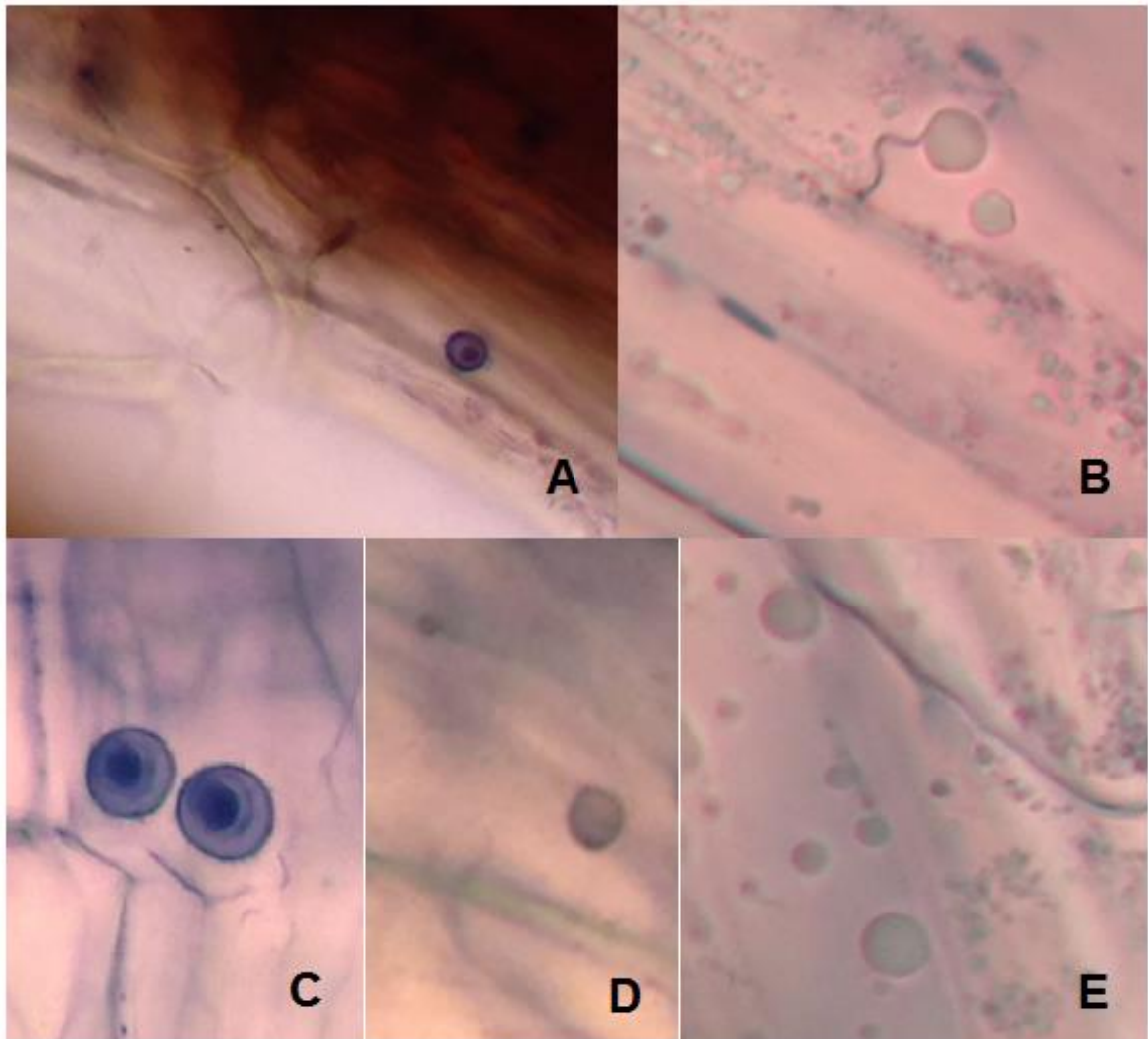


Figura 9. Esporas teñidas de HMA a partir de tinción de raíces con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970), observada en cultivo trampa de *Medicago sativa* en la zona de: A) Casitas. B) Cabuyal. C) Corrales. D) Puerto Pizarro. E) Uña de Gato.

La figura 10 muestra la presencia del pellet (ADN) luego de la extracción de ADN con el protocolo optimizado para cada zona de muestreo, El material genético se obtuvo a partir de 0,1 gr de tejido macerado, resuspendido en 30 μ l de T.E (precalentado a 60 $^{\circ}$ C). Así mismo se muestra un gel de Agarosa al 1.5 % en el cual se ha migrado ADN genómico y se pudo observar la presencia de ADN de HMA en los 5 cultivos trampa de *Medicago sativa* "alfalfa". Pese a que la cantidad de ADN obtenida en cada extracción fue poca, se consideró suficiente para realizar las reacciones de amplificación por PCR, utilizando 2 μ l de ADN en cada reacción.

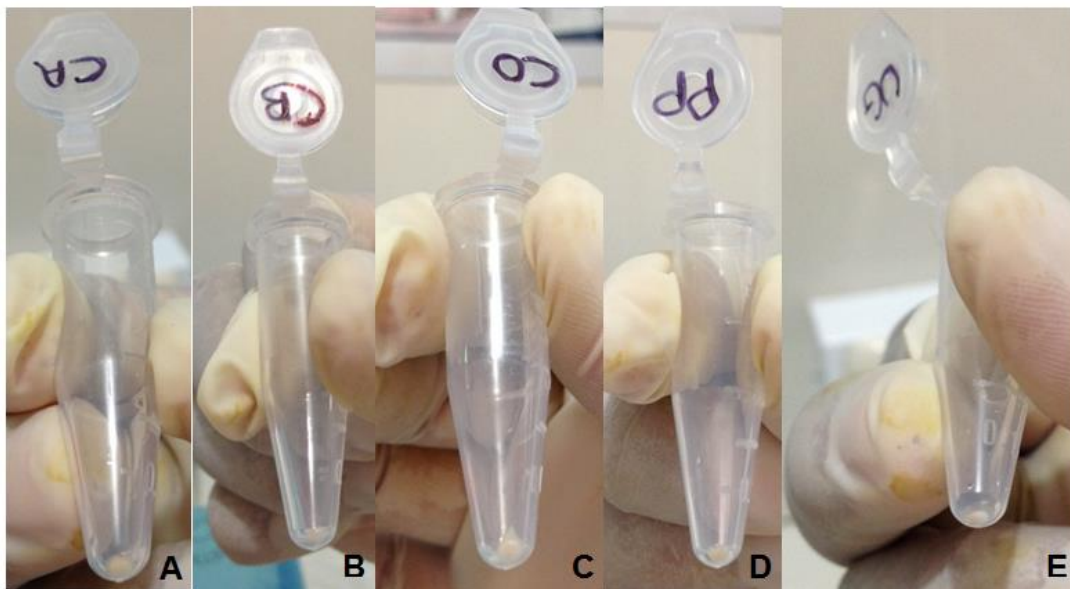


Figura 10. Tubo de 1.5 ml utilizado en extracción de ADN de HMA conteniendo el pellet en la zona de: A) Casitas. B) Cabuyal. C) Corrales. D) Puerto Pizarro. E) Uña de Gato.

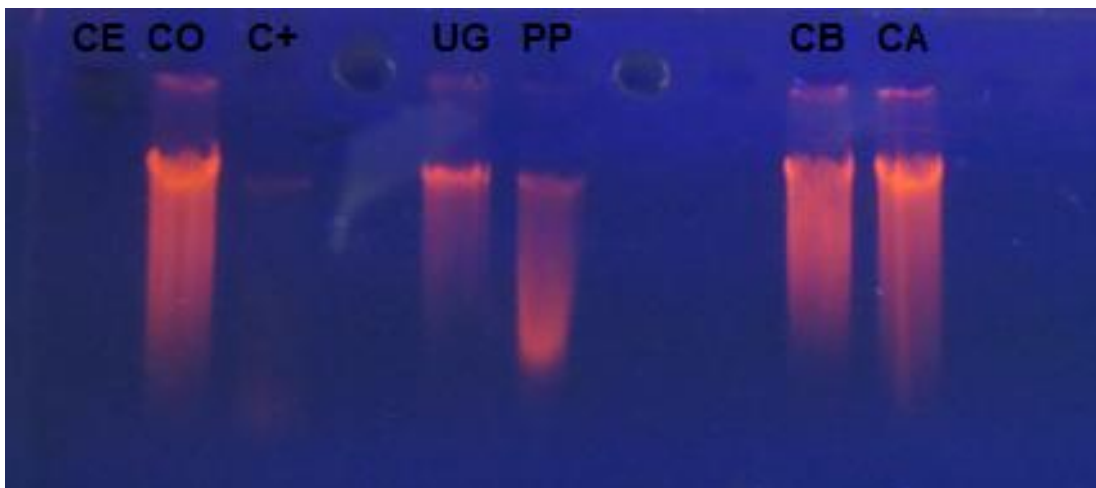


Figura 11. Migración de ADN puro extraído en gel de agarosa al 1% de HMA de las 5 zonas de muestreo. CE: Control de extracción. CO: Corrales. C+: Control positivo. UG: Uña de Gato. PP: Puerto Pizarro. CB: Cabuyal. CA: Casitas.

En la tabla 3 obtuvimos los diferentes programas optimizados para cada semi-nested PCR. La optimización del programa de PCR, condujo a probar diferentes temperaturas de desnaturalización inicial, desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores, polimerización y la polimerización final además de los tiempos y ciclos. Para cada combinatoria de Primers son 35 ciclos, siendo la desnaturalización inicial y polimerización final de 1 ciclo.

Tabla 3. Optimización del Programa de PCR para cada semi-nested PCR de HMA.

Juego de Primers	Desnaturalización inicial		Desnaturalización del ADN		hibridación de los iniciadores		Polimerización		Polimerización final	
	T°	Tiempo	T°	Tiempo	T°	Tiempo	T°	Tiempo	T°	Tiempo
1era semi-nested PCR NS5+GLOM5.8R	95 °C	4 min.	95 °C	40 seg.	51 °C	30 seg.	72 °C	40 seg.	72 °C	5 Min.
2da semi-nested PCR ITS4+GLOM1310	95 °C	4 min.	95 °C	40 seg.	50 °C	30 seg.	72 °C	40 seg.	72 °C	5 Min.
3era semi-nested PCR NS5+GIGA5.8R	95 °C	4 min.	95 °C	40 seg.	53 °C	30 seg.	72 °C	40 seg.	72 °C	5 Min.

La tabla 4, se observa los resultados obtenidos de cada semi-nested PCR para la detección de HMA presentes en la rizosfera de *O. ficus-indica* a partir de las muestras de raíz de cultivos trampa de las cinco zonas de muestreo. Así mismo muestra bandas positivas en Corrales y Cabuyal (figura 8) para la primera y tercera semi-nested PCR, esto indica que mediante esta prueba se detectó HMA en la rizósfera asociada a *Opuntia ficus-indica*.

Tabla 4. Determinación de Hongos Micorrizicos Arbusculares por Semi-nested PCR, utilizando primers específicos para las 5 zonas de muestreo. (-): Ausencia (+): Presencia (0): No procesada

ZONAS	Semi-nested PCR		
	1era semi-nested PCR NS5+GLOM5.8R	2da semi-nested PCR ITS4+GLOM1310	3era semi-nested PCR NS5+GIGA5.8R
Puerto Pizarro	(0)	(0)	(0)
Corrales	(+)	(-)	(+)
Uña de Gato	(-)	(-)	(-)
Cabuyal	(+)	(-)	(+)
Casitas	(-)	(-)	(-)
Control positivo	(+)	(+)	(+)

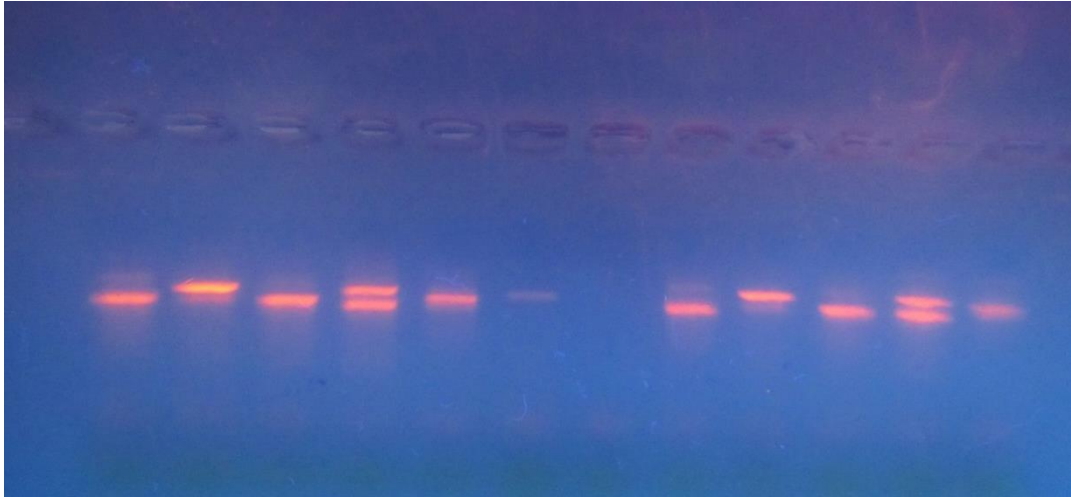


Figura 12. Visualización de los productos de PCR migrados en gel de agarosa al 1.5%. Todas las bandas migraron a una misma distancia aproximada de 300 pb.

Micropropagación *in vitro* *Opuntia ficus-indica* var. *inermis* en condiciones de laboratorio.

Los resultados de la Micropropagación invitro de *O. ficus indica*, se observan en la figura 13.

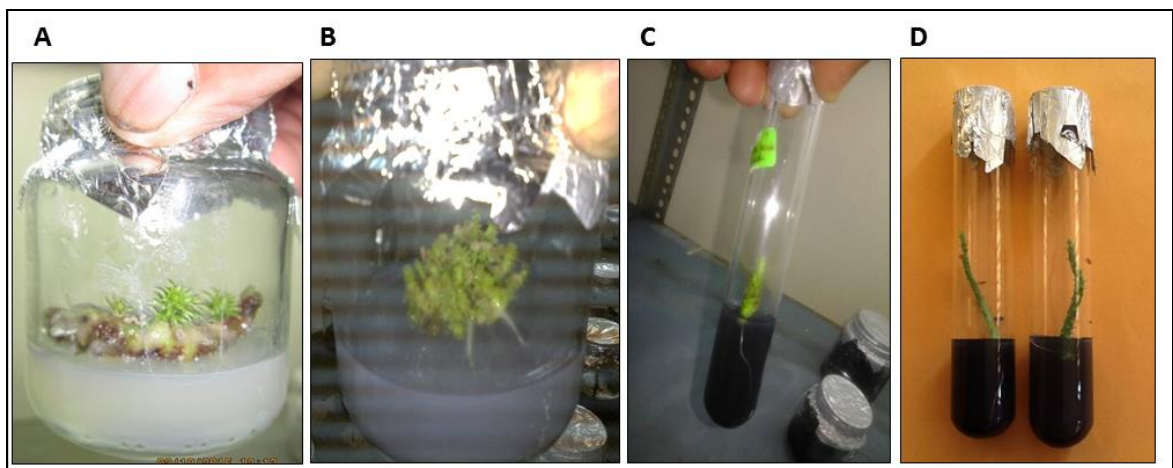


Figura 13. Micropropagación *in vitro* de *Opuntia ficus-indica* var. *inermis* en condiciones de laboratorio. (A) Fase de inicio o establecimiento. (B) Fase de multiplicación. (C) Fase de enraizamiento. (D) Plantas de *Opuntia ficus indica* var. *inermis* aptas para la aclimatación

Caracterizaciones preliminares en espectrometría de masa MALDI TOF TOF

Por otro lado el análisis proteómico muestra que es posible la identificación de *Opuntia ficus-indica*, mediante análisis proteómico pudiéndose identificar las proteínas mostradas en la tabla 5.

Tabla 5.. Secuencia de aminoácidos de iones precursores fragmentados establecida por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF de cladodios de *O. ficus-indica* con identificación subsecuente de la proteína correspondiente.

Spectrum	Prec MW	Prec m/z	Best Sequence	Conf (%)	Nombre de la proteína	Base de datos de Planta
1.I13.4.1.13	1232.6577	1233.665	RNADMNRKGR	99	30S Ribosomal protein S8	<i>Blossfeldia liliputana</i>
1.I14.4.1.7	1232.6647	1233.672	RNADMNRKGR	99	30S Ribosomal protein S8	<i>Blossfeldia liliputana</i>
1.J3.4.1.11	1232.6456	1233.653	RNADMNRKGR	99	30S Ribosomal protein S8	<i>Blossfeldia liliputana</i>
1.J7.4.1.8	2003.0657	2004.073	LAPLKTHYLIRICYAR	99	Mat R	<i>Pereskia grandifolia</i>
1.G24.9.1.4	869.5637	870.5709	VVSLSIPR	94.1	Leucine rich repeat receptor like protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
1.M18.19.1.13	1260.7267	1261.734	NLKDKFDLLR	99	Ribonuclease	<i>Nicotiana glauca</i>

(a)

Protein Sequence Coverage - 30S ribosomal protein S8 (Fragment) OS=Blossfeldia liliputana GN=rps8 PE=3 SV=1

MGRDTIADIITSIRNADMRKGRVRIASTNITESIVKILLREGF IENMRKHQERNKSLVFLVTLRHRNRKGPYRNTLMLKRVSRPSLRISYNYQRIPRILGGMGIVILSTSRGIMTDREARLERIGGEILCYIW

(b)

Protein Sequence Coverage - MatR (Fragment) OS=Pereskia grandifolia GN=matR PE=4 SV=1

GTSRWLFLEFDIRKCFHTIDRHRLISIFKEEIDDPKFFYSIQKVFSAGRLVGGKGPYSVPHSVLLSALLGNIVLHKLDOEIGRIRQKYEIPVQIRISVLLKTSRIDDLQNSGEEGFSNAPLHNRAIILDRVKSQRKAAFHSLVSSWHTLPSTPRLRGDQKRPFVFPSSALATFLNKPSSLLFAAFLIEAAGLTPKTEFYGR
EGSMNNWAMRDLFKYCKRGLLIELGEAAILVIRSEKGLARKLAPLKTHYLIRICYARADDLLLGI V GAVELLIIEIQKRIAHFLOSGLNLVWGSAGSTTIAARSTVEFLGTVIREVPPKTPPIQFLRELEKRLRVKHRHITACHLRS AIHSSFRNLGKSI PVKQLTKGHSKTGSLLDVAVQLAETLGTASVRSQVSLLDWTVK
HIRQGSREISLLHSSGQSKAPSDVQQAVSRSGMSVRKLSLYTLAQRKAAGEGGHWARSISSEPHIQIEAPIKKILRRLRDRGISRRRPWPIHVACLTVNSDGDIVNWFAGIAI

(c)

Protein Sequence Coverage - Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase OS=Arabidopsis thaliana GN=LRR-RLK PE=2 SV=1

MLASLIIFVALLCNVTVISGLNDEGFALLTFKQSVHDDPTGSLMNNWSSDENACSWNGVTCRELWVSLISIPRKNLYGSLPSSLGFLSSLRHLNLRNRFYGSLLP IQLFHLQGLQSLVLYGNSFDGSLSEEIGKLLQLTDLSQLNLFNGSLPLSILQCNRLKTLDVSPNNLSGCLPDGFGSAFVSLKLDLAFNQFNGSIPSDI
GNLSNLQGTADFSHNFHTGSIPPALGDLPEKVYIDLTFNNLSGPIQGTGALMNRGPTAFIGNTGLCGPLKDLQGYQLGLNAYPPIPSMNPPEDSDSTNSFTKQSSGLSKSAVIAIVLQVDFGICLVGLLFTYCYSKFCACNRENFQVVEKESKRASECLCFRKHDESETPSENVEHCDIVPLDAQVAFNLEELLKASAFVL
GKSGIGIVYKVVLENGTLAVRRLGEGSQRFKEFQTEVEAIGKLRPNIASLRAYYMSVDEKLLIYD TVSNGLATLHGKPGMNTIAPLTWSELRINMGIATGLVYLHEFSPKPYVHGDLKPSNILIGQDHEPKISDFGLARLANIAGGSSPTIQSNRIIQTDQQPQERQHHKVSSEFTAHSSSGSYQAPETLKMVKP
SQKWVDSYSGIILLELIAGRSPAVEVGTSEMDLVRWVQVCIIEKKPLCDVLDPLAPEAETEDIVAVLKIASCVNSSPEKRP TNRHVSDTLDRLPVAGD

(d)

Protein Sequence Coverage - Ribonuclease OS=Nicotiana glauca GN=rbcL PE=2 SV=1

MFGSQLMFLVFLIFLFLSLSPVYGTDFDQLQLVLTWPPSFCGKPCPTRIPKNTIHLGLWPEQHGHLNDCGETFTKLRPREKKEKELDDRWPDLRKRSRSDAQDQVQSFWEYFYNKHGTCCTELTDQAAFYDLARMLKDKFDLLRNLKNEGIIIPGSTYTVDEIAEAIRAVTQAYPNLNCVGDPPQKILELSEIGICFDRGATKVTICRRRTT
CNPINKKEISFPLN

Figura 14. Secuencia de aminoácidos alineadas de: (a) DNA-directed RNA polymerase sub unit beta, (b) MatR fragment, (c) Leucine-rich repeat receptor like protein kinase y (d) Ribonuclease.

V. DISCUSIÓN.

El análisis físico químico de los suelos mostraron que éstos son bajos en porcentaje de nitrógeno (0.04 a 0.16) (Tabla 1), lo que podría aportar al bajo contenido de materia orgánica (0.71 a 3.82). Los suelos que contienen fósforo mayor a 36 ppm y potasio mayor a 175 ppm son óptimos para cultivos agronómicos (Espinoza *et al.*, 2006), así en nuestros resultados podemos observar que el contenido de fósforo es óptimo en todos los puntos de muestreo excepto en Puerto Pizarro, así mismo el potasio se encuentra en niveles óptimos en todos los puntos de muestreo. Gallego (1943), Sivila y Hervé (1994) y Ramos y Zuñiga (2008) relatan que las bacterias son favorecidas por valores de pH alcalinos y neutros, así los suelos de las cinco zonas analizadas poseen un pH entre 6,73 – 8,37 lo que podría explicar la elevada presencia de bacterias en las muestras.

A si mismo en los resultados de la tabla 1 se observa que tanto los suelos de Corrales y Cabuyal son de textura Arena Franca además en Uña de Gato y Puerto Pizarro son de textura Franco Arenoso, los mismos que poseen buena diversidad bacteriana, esto se debería a que las porosidades entre partículas arenosas de diversos tamaños ayudan al desarrollo de las comunidades bacterianas, por otro lado en el suelo con textura franco Limoso (Casitas) se ha encontrado una mayor diversidad bacteriana en comparación a las texturas arenosas, esto podría ser debido a que en un suelo bien graduado (muchos diferentes tamaños de partículas mezclados entre sí), las partículas de limo recubren las superficies de los granos de arena y actúan como puentes entre ellos, permitiendo un mejor flujo de agua y nutrientes que son aprovechados por las bacterias (Chau *et al.*, 2011).

Por otro lado con respecto a HMA , el rango de pH del suelo de las 5 zonas de muestreo fue de 7.74 a 8.37 (Tabla 1). Los hongos micorrícicos arbusculares varían en su tolerancia al pH, y la esporulación en ciertas especies disminuye con el aumento de pH (Suchitra *et al*, 2012). Para el género *Glomus* la esporulación de HMA aumenta con pH de 6 a 9 y para el género *Gigaspora* aumenta su esporulación con un pH de 5 a 6 dependiendo de la especie (Valsakumar *et al.*, 2007), por ello podríamos deducir que el suelo de la rizósfera de *O. ficus-indica* es rica en el género *Glomus* según las condiciones de pH. Los niveles de nitrógeno oscilaron a partir de 0.04% (Uña de Gato) a 0.16% (Puerto Pizarro). Las hifas de los hongos micorrizicos arbusculares tienen la capacidad de absorber y transportar el nitrógeno del suelo a las raíces (Clark y Zeto, 2000). El nitrógeno suprime la colonización de las raíces por hongos micorrizicos arbusculares (Mosse y Phillips, 1961; Valsakumar *et al.*, 2007) Los hongos micorrícicos arbusculares colonizaron las raíces del cultivo sólo cuando carecía de Nitrógeno (Buwalda y Goh 1982; Valsakumar *et al.*, 2007). Para este caso observamos que el porcentaje de nitrógeno era muy bajo con lo que podemos deducir que hay una alta colonización de HMA.

Nuestros resultados presentados en la tabla 2, muestran el listado de bacterias cultivables presentes en la rizosfera de *O. ficus-indica* en los cinco zonas de muestreo, de ello podemos decir que este listado que corresponde a un bajo porcentaje (1%) de bacterias de la rizósfera que se pueden obtener en medios de cultivo en comparación a las especies determinadas por metagenómica (Prashar, 2014).

Según Schoebitz (2006) y Prashar (2014) aproximadamente alrededor de 2 – 5% de las bacterias presentes en la rizósfera son Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (RPCP), en nuestros resultados presentados en la tabla 2 destaca la presencia de generos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Acinetobacter* que son conocidos por ser RPCP (Döbereiner, 1995), entre las principales funciones de estos géneros se

encuentran el mejoramiento del contenido de nitrógeno en el suelo y por ende el mejoramiento del crecimiento de la planta, producción de sideróforos y fitohormonas, conversión de las formas insolubles del fósforo para hacerlo más accesible para la planta, resistencia a metales, etc (Loredo, 2004; Schoebitz, 2006; Prashar, 2014).

Avances recientes en técnicas moleculares han permitido determinar cepas de bacterias no cultivables, generando información vital relacionada a las comunidades bacterianas de la rizósfera (Nogales, 2005; Prashar, 2014). El estudio global de los genomas de todos los microorganismos presentes en una comunidad se denomina metagenómica y ya ha sido realizado con éxito en comunidades microbianas de suelo (Rondon *et al.*, 2000). Las estimaciones más conservadoras acerca de la complejidad genética de comunidades microbianas de suelos indican la presencia de entre 6.000 y 10.000 genomas diferentes en suelos orgánicos no perturbados y un número menor (entre 350 y 1.500) en suelos agrícolas (Nogales, 2005). Nuestros resultados se asemejan a lo descrito por Nogales (2005) en cuanto al número de especies encontradas en los cinco puntos de muestreo que oscilan entre 176 a 683 en base a esto podemos hacer una idea de la magnitud de información nueva que se ha generado en este trabajo.

Ondov y Phillippy (2011) hablaron del Mg – Rast como un navegador en la web para la visualización de la metagenómica interactiva, ellos clasificaron taxonómicamente y funcionalmente los resultados obtenidos de las muestras y detallan que este servidor resume los elevados rangos (filo y orden) para encajar dentro de un mismo espacio limitando el alcance de una visión en conjunto, de las figuras 2 y 3 se puede afirmar que el suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas) pero siendo las bacterias las que más predominan en cuanto a porcentaje de abundancia.

Ottesen *et al.* (2013) estudiaron la ecología microbial del tomate en diversos órganos de la planta, incluyendo los microorganismos asociados a la raíz, para el análisis de datos, ellos emplearon el programa MG – Rast, basados en esta referencia y teniendo en cuenta nuestros resultados mostrados en la figura 3, en donde se detalla a los ordenes de las bacterias presentes en los cinco puntos de muestreo, los mismos que se agrupan por clase, siendo la clase Gammaproteobacteria la que alberga mayor número de géneros, seguido de la clase Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Betaproteobacteria, Verrucomicrobiae, Acidobacteriia, Solibacteres, Aquificae, Bacteroidia, Cytophagia, Flavobacteriia, Sphingobacteriia, Chlamydiia, Deinococci, Bacilli, Clostridia, Negativicutes, Fusobacteriia, Nitrospira y Planctomycetia, esto coincide con lo descrito por Nogales (2005) y Turner *et al.* (2013) quienes mediante estudios moleculares de suelos detectaron a los grupos filogenéticos bacterianos Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteriia y Verrucomicrobiae presentes más frecuentemente en las muestras; así mismo, evidenció que algunos grupos microbianos se encontraban presentes de forma ubicua, tratándose en ocasiones de grupos descritos en otros ambientes pero cuya presencia en suelos ni tan siquiera se sospechaba, entre los ejemplos de estos grupos podrían mencionarse los Planctomycetia, que se habían descrito previamente exclusivamente en ambientes acuáticos.

Se observa la curva de rarefacción la cual indica la riqueza de especie de los cinco puntos de muestreo. Las muestras procedentes de Casitas presentan mayor riqueza de especie a aproximadamente 90 000 números de lecturas, a diferencia de las muestras obtenidas de Corrales las cuales presentan menor número de riqueza de especie a aproximadamente 70 000 número de lecturas. Esto es similar a lo obtenido por Ottesen *et al.* (2013) quienes realizaron la curva de rarefacción para determinar la cantidad de Unidades Taxonomicas Operacionales (OTU) en relación a todas las secuencias muestreadas para todos los órganos de la planta estudiada.

En cuanto a la biodiversidad alfa, la misma que sirve para comparar directamente la α -diversidad (dentro de la muestra la diversidad o la estimación de la riqueza de especies) (Peiffer *et al.*, 2013) así las muestras colectadas en Casitas y Corrales presentan mayor porcentaje de biodiversidad con un 37.58% y 37.31% respectivamente, y un menor porcentaje en las muestras procedentes de Cabuyal y Uña de Gato, con 14.48% y 16.81% respectivamente.

El antagonismo presente entre bacterias es caracterizado por la inhibición del crecimiento de una contra la otra, por diversos factores como nutriente, espacio, luz y o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios entre ellos sustancias antibacterianas (Fernández y Vega, 2001). Esto puede ser observado en nuestros resultados mostrados en la tabla 3 en donde las bacterias aun siendo del mismo género ocasionan este fenómeno antagonico. En los consorcios de *Enterobacter* y *Acinetobacter* se observan halos de inhibición en en solo dos especies para cada consorcio, por otro lado las especies del consorcio *Pseudomonas*, esto último también fue observado por Validov (2005) quien observa fuerte actividad antagónica en el género *Pseudomonas*.

Por otro lado con respecto a HMA, el potencial de la diversidad de estos HMA en 5 suelos diferentes de Tumbes fue evaluada mediante el método del tamizado estándar como se describe por Gerderman y Nicholson (1963). La diversidad de HMA es esencial para la colonización y la formación de la relación simbiótica entre la planta y los hongos (Hijri *et al.*, 2006; Smith y Read, 2008). Los HMA tienen un impacto considerable en el crecimiento vegetal y la administración de estos en la agricultura sostenible es esencial (Klironomos, 2003; Prieto, 2012). El estudio de la riqueza de HMA para cada suelo será útil para el desarrollo eficaz de *O. ficus-indica*.

Para evaluar la propagación micorrízica, se llevó a cabo mediante su tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970) y observación al microscopio óptico de las estructuras características de esta asociación (esporas, hifas) (Suchitra et al, 2012). La propagación en cultivos trampa de *Medicago sativa* “alfalfa” y la utilización de estas plantas con periodo vegetativo corto permite la obtención de una mayor cantidad de HMA (Coyne, 2000; Prieto, 2012). En nuestros resultados observamos que el cultivo trampa utilizado fue efectivo para la propagación de HMA, los cuales son un grupo de microorganismos del suelo, que no pueden cultivarse en medios sintéticos en ausencia de la planta hospedera. (Shafiqua y Stephan, 2013).

Es importante mencionar además que para el análisis molecular se realizó como primer paso la extracción de ADN de HMA a partir de raíces frescas de cultivos trampa de *Medicago sativa* “alfalfa”, para ello se optimizó el protocolo teniendo en cuenta que para la extracción de ADN debe contener las siguientes fases: lisis celular, purificación, precipitación, lavado, secado y resuspensión del ADN (Luke J. y Herráez A, 2002).

En el protocolo optimizado usamos para la maceración el nitrógeno líquido, este va a permitir la lisis celular o ruptura de la célula. El empleo del nitrógeno líquido en el protocolo optimizado de extracción de ADN a partir de raíces frescas es utilizado porque ha permitido aumentar el rendimiento y la calidad del material genético obtenido. (Luke J. y Herráez A, 2002).

Además usamos el buffer CTAB 2x el cual está compuesto por PVP, β -mercaptoetanol, NaCl Tris HCl (pH 8), EDTA (pH 8) y CTAB, con una concentración de 5%, 4%, 1.4 M, 100 mM, 20mM y 3% respectivamente (Khan et al., 2007; Michiels et al., 2003; Shafiqua, G y Stephan, R., 2013); usamos estas concentraciones de estos componentes químicos porque va a permitir la eliminación de metabolitos secundarios y los polisacáridos en la extracción de

ADN, ya que el buffer CTAB actúa como detergente y se une a los polisacáridos eliminándolo durante el proceso de extracción. (Michiels et al., 2003; Khan et al., 2007; Kumar et al., 2003).

En la fase de purificación usamos fenol buferiado y cloroformo alcohol/isoamilico con la finalidad de visualizar tres fases (ADN, proteínas y lípidos) en el tubo de 1.5 ml, lo cual solo separamos con facilidad el ADN genómico (Luke J. y Herráez A, 2002). Para la fase de precipitación utilizamos isopropanol helado y lo incubamos a -20 °C durante toda la noche porque la cantidad y calidad del ADN aislado depende de la temperatura de precipitación y la duración según Michiels *et al.*, (2003).

En el lavado usamos etanol al 75% que es el que va a permitir la eliminación de sales presentes en la muestra, además dejamos secar a temperatura ambiente el pellet para la evaporación de restos de etanol y lo resuspendemos en T.E. o Tris-HCL PH 8.0 que sirve de tampón y estabilizador de PH y EDTA PH 8.0 que es un quelante de iones divalentes (Shafiqua, G y Stephan, R., 2013). Para el tratamiento con ARNasa utilizamos 1 µl con la finalidad de eliminar restos de ARN y obtener ADN puro (Khan et al., 2007).

Una vez obtenido el ADN genómico (figura 6) se llevó a migrar en un gel de agarosa al 1% con la finalidad de observar la presencia del ADN genómico. En el transiluminador conteniendo el gel de agarosa observamos bandas positivas fuertes y leves, las bandas positivas fuertes se debe a que si hay una buena concentración de ADN y por otro lado las bandas positivas leves se debe a que no hay buena cantidad de ADN debido que no es muy fácil obtener ADN fúngico según Michiels *et al.*, (2003).

En nuestro trabajo usamos la técnica de semi-nested PCR, optimizando el programa para la primera y segunda corrida; esta técnica está basada en el uso de 2 jugos de primer universales que en nuestra investigación son ITS4 y

NS5, los cuales cuenta con una temperatura de desnaturalización, hibridación y polimerización (Redecker, 2000).

Se utilizaron en las reacciones para la prueba de especificidad y la amplificación de las raíces, se llevó a cabo un procedimiento de dos pasos (semi-nested PCR). Inicialmente y de acuerdo al programa optimizado de PCR se realizó una primera amplificación con los oligonucleótidos universales para eucariontes, NS5 e ITS4 con una temperatura de hibridación de 51 °C (Redecker, 2000). Técnicas basadas en PCR se han convertido en obligatoria para obtener cantidades suficientes de ADN, ya que estos organismos no son cultivables y por lo tanto sólo una pequeña cantidad de ADN puede ser aislado de raíces infectadas (Michiels et al., 2003; Shafiqua, G y Stephan, R., 2013).

A partir de los productos obtenidos en la amplificación con estos Primers universales se realizaron amplificaciones anidadas con los oligonucleótidos GLOM5.8R, GLOM1310 y GIGA5.8R, específicos para los diferentes géneros o especies con el fin de obtener fragmentos de ADN de hongos. Las reacciones fueron contadas positivas cuando fueron consistentemente presentes productos del tamaño esperado (Redecker, 2000). El Producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, seguido por tinción con bromuro de etidio (figura 24). Raíces de las plantas o esporas fúngicas de HMA pueden contener diversos compuestos que inhiben la amplificación por PCR (Redecker, 2000).

Finalmente el análisis proteómico mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF se ha convertido en una herramienta avanzada para estudios de una larga variedad de moléculas biológicas involucradas en la fisiología de plantas sometidas a diferentes condiciones de estrés (Kaspar, *et al*, 2011), En nuestro trabajo ha sido posible identificar una serie de proteínas involucradas en los procesos de replicación del ADN (DNA-polimerasa y ribonucleasa),

identificación phylogenética de plantas (MatR) (Zhu, *et al* 2007) y finalmente un miembro putativo de receptores de transmembrana tipo quinasa (Leucine-rich repeat receptor like protein kinase) comúnmente involucrados en la respuesta inmune de plantas así como en detección de señales endógenas de regulación del desarrollo (Torii, 2004).

VI. CONCLUSIONES.

Se identificó mediante secuencias nucleotídicas del gen 16S rRNA de las bacterias presentes en la rizósfera de *O. ficus-indica* en ecosistemas áridos de Tumbes, Perú, con un total de 48 bacterias identificadas por cultivo *in vitro* mientras hasta 683 especies han sido identificadas mediante la metodología de metagenómica dirigida independientemente de cultivo *in vitro*, además ha sido posible optimizar protocolo de extracción de ADN y programas de semi-nested PCR para la identificación de los géneros *Glomus* y *Gigaspora* de HMA, finalmente se logró identificar a proteínas de *O. ficus-indica* mediante la técnica de espectrometría de masa MALDI TOF TOF MS.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguilera-Gómez L, Ft Davies Jr, V Olaldeportugal, Sa Duray & L Phavaphutanon (1999) Influence of phosphorus and endomycorrhiza (*Glomus intraradices*) on gas exchange and plant growth de suelos: 101-112. PROEDAF, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Aguirre-Garrido J. F.; Montiel-Lugo D.; Hernández Rodríguez C.; Torres-Cortes G. ; Milan V.; Toro N. ; Martinez Abarca F.; Ramirez Saad H. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:891–904.
- Alary, V., Nefzaoui, A. y B. Jemaa. (2007). Promoting the adoption of natural resource management technology in arid and semi-arid areas: modelling the impact of spineless cactus in alley cropping in Central Tunisia. *Agricultural systems*, 94 (2): 573-585.
- Amann, R., Wolfgang, L., y Karl, S. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59 (1): 143-69.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Balen, (2007). Assessment of N-Glycan Heterogeneity of Cactus Glycoproteins by One-Dimensional Gel Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques*. 18:162–172.
- Bazinet, L., y Cummings, P. (2012). A comparative evaluation of sequence classification programs. *BMC bioinformatics*, 13 (1), 92.

- Buwalda y Goh 1982; Buwald.a, J. y Goh, K. (1982). Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesiculararbuscular mycorrhizal ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 103-106.
- Cano, M., Alejandro. (2011). Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 14(2), 15 – 31.
- Chau, J., Bagtzoglou, A. y Willig, M. (2011). The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environmental Forensics*, 12, 333–341.
- Clark, R. y Zeto, S. (2000). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*. 23:7, 867-902.
- Coyne, M. (2000). Microbiología del suelo. Un enfoque exploratorio. Micorrizas. Paraninfo. Madrid, España. 416 p
- De-Bashan, L., Holguin, E., Glick, G., y Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. Mexico: Trillas. Pág. 170-224.
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, M. y Ahmad, N. (1995). Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertil. Res.* 42, 339-346.
- Espinosa, J; Belalcázar, S. 2006. Fertilization of plantain in high densities. Potash and Phosphate Institute, Latin America Office and Colombian Institute of Agronomic Research, Armenia – Colombia (en línea). Consultado 20 dic. 2006.
- Ferrera. C. 1993. Manual de Agromicrobiología. Ed. Trillas. 1 Ed. México 144p.
- Fernández O, Vega L. (2001) Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario, En: Manejo integrado de plagas, Costa Rica; (62). p. 96-100.
- Gans, J., Wolinsky, M., y Dunbar, J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309 (5739), 1387 - 1390.

- Gerderman, J., Nicholson, T. (1963). *Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting*. Transactions of the British Mycological Society 46:235-244.
- Gerlach, W., y Stoye, J. (2011). Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. *Nucleic acids research*, 39 (14), e91.
- Glass, E., M., Wilkening, J., Wilke, A., Antonopoulos, D., y Meyer, F. (2010). Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010 (1), pdb.prot5368.
- Gómez, L., Hernández, M., Herrera, M., Arroyo, F., Vargas, R., Olalde, P. (2012). Aislamiento de Bacterias Promotoras del Crecimiento de la Rizósfera de Plantas de Guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, 8(3). pp. 97-102. Universidad Autónoma Indígena de México.
- Hamady, M., Walker, J., Harris, J., Gold, N., y Knight, R. (2008). Errorcorrecting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature methods*, 5 (3), 235-7.
- Handelsman J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*.68:669–85.
- Hijri, I., Sykorová, Z., Oehl, F., Ineichen, K., Mäder, P., Wiemken, A. y Redecker, D. (2006). Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*. 15, 2277–2289
- Hodge, A., Robinson, D. y Fitter, AH. (2000). An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from nutrient-rich patches in soil. *New Phytologist* 145: 575-584.
- Horton, M., Bodenhausen, N., y Bergelson, J. (2010). MARTA: a suite of Java-based tools for assigning taxonomic status to DNA sequences. *Bioinformatics*, 26 (4), 568-569.
- Hugenholtz, P., Brett, G., y Norman, P. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180 (18), 4765-4774.
- Khan, S., Qureshi, I., Alam, T. y Abdin, M. (2007). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology*. 6(3):175-178.

- Kaspar Stephanie; Peuker Manuela; Svatos Ales; Andrea Matros y Hans-Peter Mock . (2011). MALDI-imaging mass spectrometry An emerging technique in plant biology. *Proteomics* 11, 1840–1850.
- Klironomos, J. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84(9):2292-2301.
- Kumar, A., Pushpangadan, P., y Mehrotra, S. (2003). Extraction of highmolecular weight DNA from dry root tissue of *Berberis lycium* suitable for RAPD. *Plant. Mol. Biol. Rep* 21: 309a-309d. Lay J. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2012;172:194.
- Liu, B., Gibbons, T., Ghodsi, M., Treangen, T., y Pop, M. (2011). Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. *BMC genomics*, 12 (2), S4.
- Loredó, O., López, R., Espinosa, V., (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión *TERRA. Latinoamericana*, 22(2). pp. 225-239. Universidad Autónoma Chapingo México.
- Luke J., Herráez A., *Biología Molecular e Ingeniería genética*. 2002. El Sevier. Science. Madrid. España.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A., El-behairy, U., Sorlini, C., Cherif, A., Zocci, G. y D. Daffonchio. (2012). *A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming*. Edit. J. Gilbert. *Microbial Diversity and Plant Drought Resistance*. Argonne National Laboratory. Estados Unidos de América.
- Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M., Van Riet, L. y Van Laere, A. (2013). Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry* 315: 85–89.
- MINAM. (2011). *La desertificación en el Perú*. Cuarta Comunicación Nacional del Perú a la Convención de Lucha contra la Desertificación y la Sequía. 77 pags.
- Mosse y Phillips, 1961; Mosse, B. y Phillips, J. (1971). The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. *Journal of General Microbiology* 69, 157-166.

- Muyzer, G., de Waal, E., y Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and environmental microbiology*, 59 (3), 695 - 700.
- Neelakanta G.y Sultana H. (2013). The Use of Metagenomic Approaches to Analyze Changes in Microbial Communities. *Microbiology Insights*:6 37–48.
- Nobel, P. (2002). *Cacti: Biology and use*. University of California press. Berkley, Los Angeles, Londres. Pag. 291.
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*, 14 (2), 41-51.
- Ondov, B., Bergman, N. y Phillippy, A. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12, 385.
- Ottesen, A., González, A., White, J., Pettengill, J., Li, C., Allard, S., Rideout, S., Allard, M., Hill, T., Evans, P., Strain, E., Musser, S., Knight, R. y Brown, E. (2013). Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*, 13, 114.
- Peiffer, J., Sporb, A., Korenb, O., Jinb, Z., Tringed, S., Dangle, J., Bucklera, E. y Ley, R. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS*, 110(16), 6548 – 6553.
- Pernasetti, S., y Di Barbaro, G. (2012). Rizobacterias Promotoras Crecimiento Vegetal como Biofertilizantes. *Biología en Agronomía*, 2 (2).
- Phillips, J. y Hayman, D. (1970). Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 158 – 161.
- Prashar Pratibha; Neera Kapoor; Sachdeva Sarita (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 13:63–77.
- Prieto, O., Belezaca, C., Mora, W., Garces, F.; Sabando, A. y P. Cedeño. (2012). Identificación de hongos micorrizicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano. *Agronomía mesoamericana* 23(2):233-239.
- Redecker, Dirk. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*.10:73–80.

- Reynolds, S. (2003). “El nopal (*Opuntia spp.*) como forraje” en *Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura y la Alimentación*. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s04.htm#BM04>
- Rondon, R., August, R., Bettermann, D., Brady, F., Grossman, H. y Liles, R. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol*, 66, 2541-2547.
- Sala-Comorera L, Vilaró C, Galofré B, Blanch AR, García-Aljaro C. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant. *Int J Hyg Environ Health*. 2016 Jan 14. pii: S1438-4639(16)00002-X.
- Sandrin T, Goldstein J, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev*. 2013;32(3): 188–217.
- Shafiqua, G., y Stephan, R. (2013). Molecular detection of Arbuscular mycorrhizal fungi in calcareous soil and roots of *Zea mays* L. *J. Acad. Indus. Res*. Vol. 1(9).
- Schoebitz, C., Mauricio. (2006). Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* sp.). Tesis Licenciado Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile.
- Schreiber, F., Gumrich, P., Daniel, R., and Meinicke, P. (2010). TreePhyler: fast taxonomic profiling of metagenomes. *Bioinformatics*, 26 (7), 960 - 961.
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., and Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature methods*, 9 (8), 811-4.
- SENAMHI. 2015 Disponible en: http://www.senamhi.gob.pe/include_mapas/_dat_esta_tipo.php?estaciones=000132
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain J, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):543–551
- Shah, N., Tang, H., Doak, T., G., and Ye, Y. (2011). Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 16, 165 - 176.

- Smith S., Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edition. Elsevier Ltd., London, England.
- Smith, S., Read, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. 2 ed. Academic press limited. Londres, England. 605 p.
- Stein, J., Terence, M., Ke Ying, W., Hiroaki, Sh., y DeLong, E. (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *Journal of bacteriology*, 178 (3), 591 - 599.
- Suchitra R., Kumutha K, Balachandar D. (2012) Morpho-Typing and Molecular Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sub-Tropical Soils of Coimbatore Region, Tamil Nadu, India. *Indian J Microbiol*. 52(2):145–152.
- Thompson, J. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In Stewart, BA. *Advances in soil sciences*. Springer-Verlag, New York. p. 1-40.
- Tringe, S., G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A., Chen, K., Chang, H., W., Podar, M., Short, J., M., Mathur, E., J., Detter, J., C., Bork, P., Hugenholtz, P., and Rubin, E., M. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308 (5721), 554 - 557.
- Torii Keiko U. (2004) Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases in Plants: Structure, Function, and Signal Transduction Pathways. *International Review of Cytology*, Vol. 234.
- Turner, T., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., y Poole, P. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*, 7, 2248–2258.
- UNEP. 2006. *Los desiertos: perspectivas 2006*.
- Validov S1, Mavrodi O, De La Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, Mavrodi D. (2005). Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett*. 2 242(2):249-56.
- Valsakumar, N., Ray, J. y Potty, V. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with Green gram in South India. *Agron J* 99:1260–1264.

- Van der Heijden, M. (1998). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79(6):2082-2091
- Venter, J., Remington, K., Heidelberg, J., Halpern, A., Rusch, D., Eisen, J., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K., Nelson, W., Fouts, D., Levy, S., Knap, A., Lomas, M., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y - H y Smith, H. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304 (5667), 66-74.
- Zhu XY1, Chase MW, Qiu YL, Kong HZ, Dilcher DL, Li JH, Chen ZD. (2007). Mitochondrial matR sequences help to resolve deep phylogenetic relationships in rosids. *BMC Evol Biol.* Nov 10;7:217.

VIII. ANEXOS



Figura 15. Preparación del material para la toma de muestra.



Figura 16. Toma de muestra de la rizósfera de *Opuntia ficus – indica* en el distrito de Casitas.



Figura 17. Siembra de bacterias.



Figura 18. Purificación de bacterias.



Figura 19. Bacterias purificadas sembradas en caldo nutritivo.

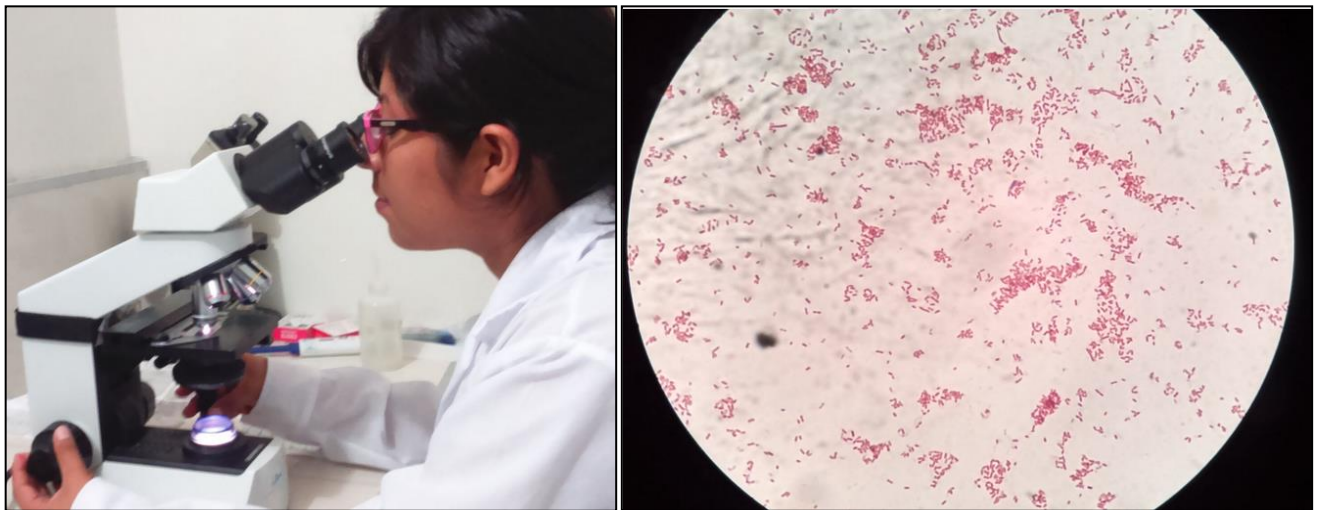


Figura 20. Vista al microscopio de las bacterias purificadas.



Figura 21. Extracción de ADN de las bacterias presentes en la rizósfera.



Figura 22. Termociclador con el programa 16S para bacterias.



Figura 23. Depositando las muestras de ADN en gel de agarosa para el corrido electroforético.

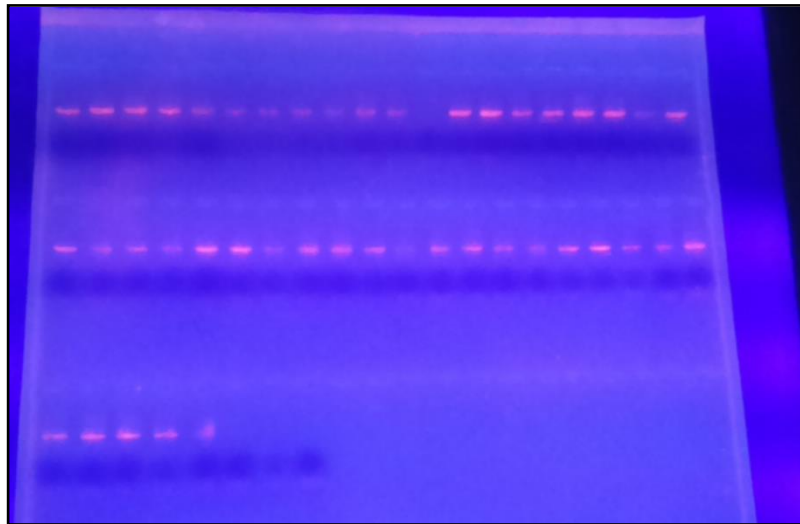


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) del ADN bacteriano de la rizósfera de las muestras de Casitas.

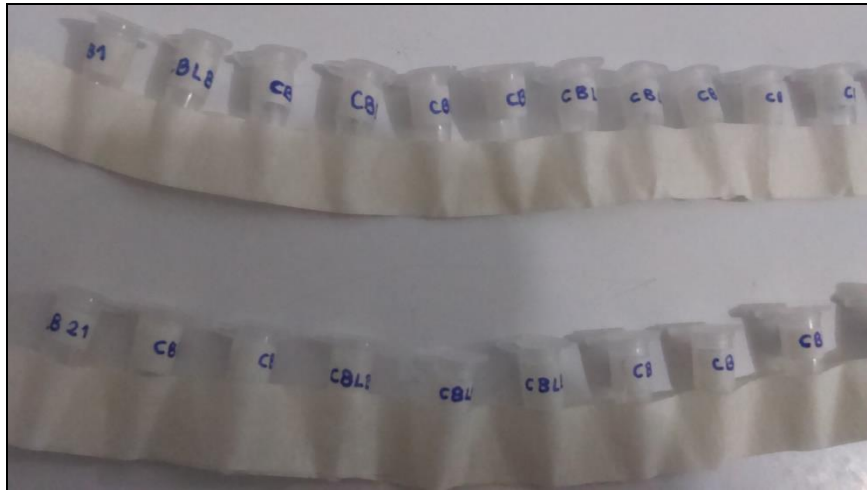


Figura 25. Muestras de amplicón de ADN listos para enviar a secuenciar.

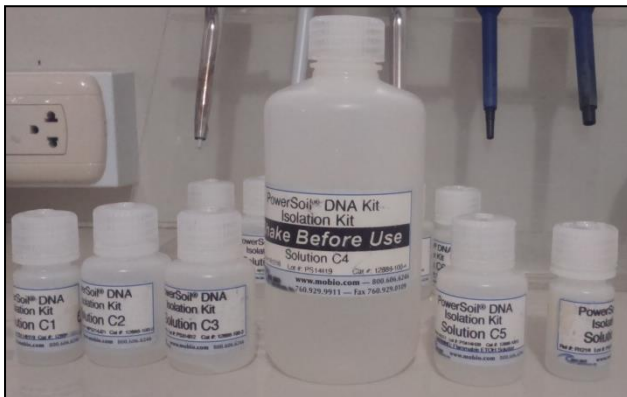


Figura 26. Kit Power Soil para la extracción de ADN por Metagenómica.

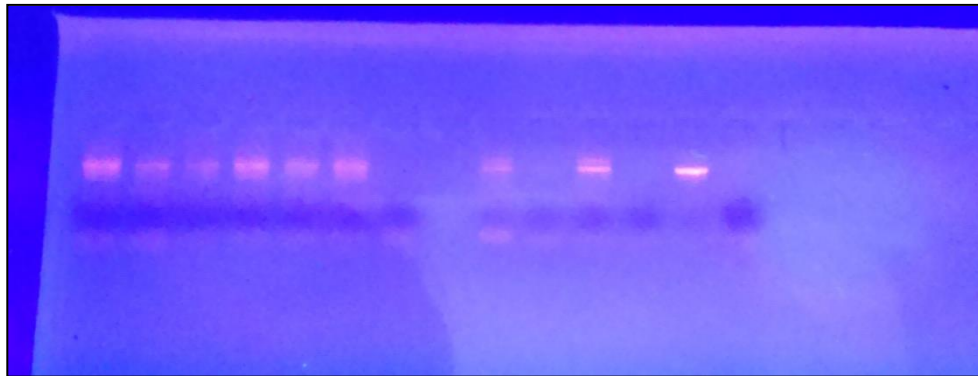


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) del ADN bacteriano obtenido por Metagenómica.

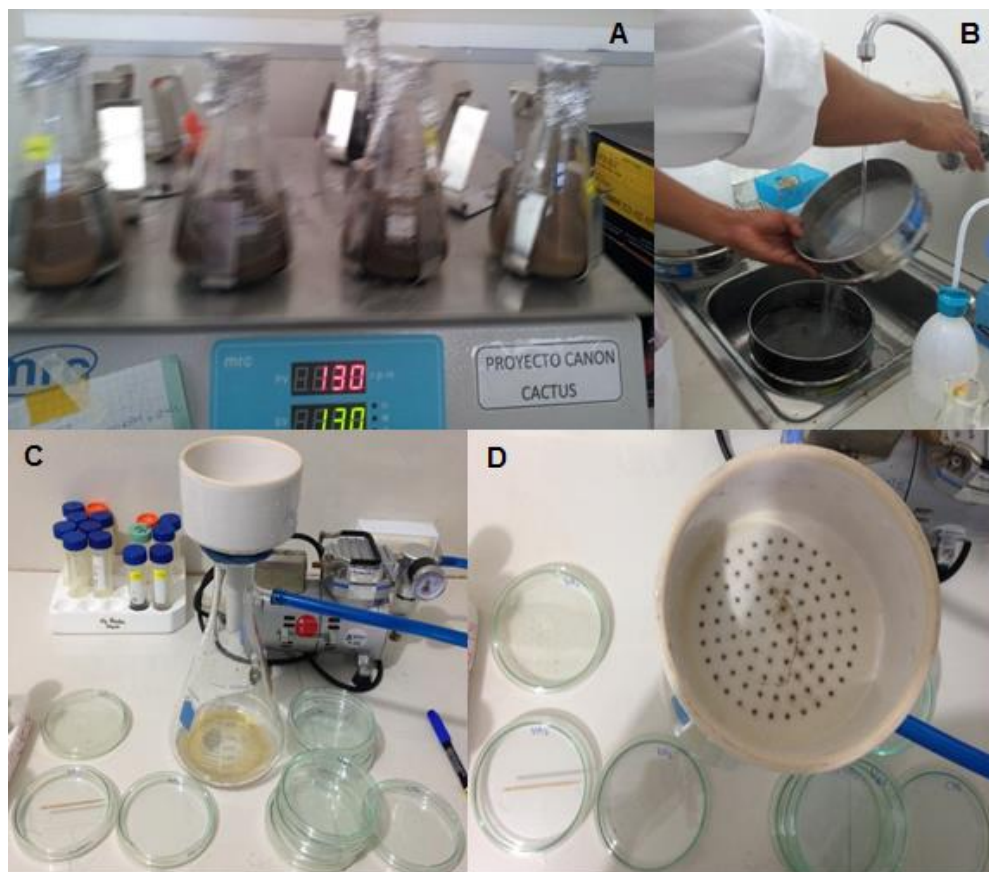


Figura 28. Metodología usada en el aislamiento de HMA. (A) Muestras de suelo en el shaker. (B) Recojo de material que quedó atrapado en los diferentes tamices. (C) Embudo Buchner conectado a una bomba de vacío. (D) Papel filtro con esporas de hongos micorrizicos arbusculares.



Figura 29. Cultivos trampa de alfalfa. (A) Masetas desinfectadas. (B) Sustrato estéril inoculada con una capa homogénea de HMA. (C) Siembra de las semillas de alfalfa. (D) Diferencias de crecimiento del control positivo y control negativo.



Figura 30. Tinción de raíces de HMA. A) Preparando reactivos para la tinción. B) Raíces extraídas de los cultivos trampa de alfalfa. C) Raíces cortadas y lavadas con agua estéril. D) Tubos con las raíces teñidas.

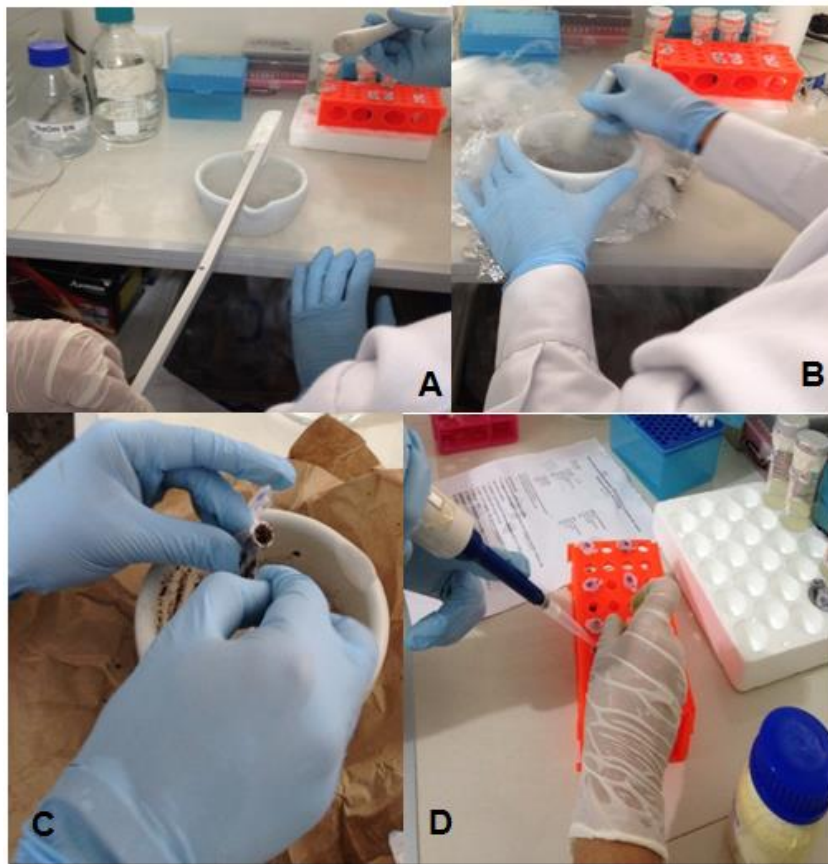


Figura 31. Extracción de ADN de HMA. (A) Agregándole nitrógeno líquido a la muestra de raíz. (B) Trituración de las raíces en un mortero con nitrógeno líquido. (C) Traspasó de lo triturado a un microtubo de 1.5ml. (D) Agregándole 600µl del Buffer de Extracción CTAB 2X (pre-calentado a 60°C) a la muestra triturada.

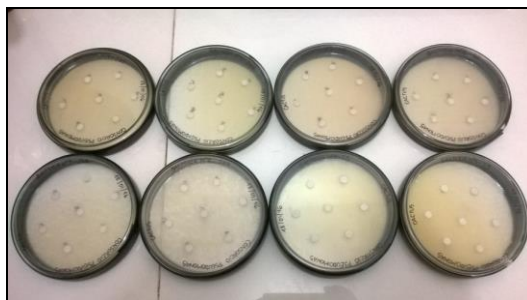


Figura 32. Antagonismo intra-genero de bacterias asociadas a la rizósfera de *O. ficus indica*.

Tabla 6. Medio de cultivo para la fase de establecimiento

MURASHIGE Y SKOOG(1962)	
MACRONUTRIENTES	UNICAS
MICRONUTRIENTES	UNICAS
VITAMINAS	
Inositol	100mg
Tiamina	100µg/L
Ac. Nicotinico	500µg/L
Piridoxina	500µg/L
AMINOACIDOS	
Glycina	2mg/L
REG. CRECIMIENTO	
BAP	1
OTROS	
Ph	5.8
AZUCAR	30mg/L
AGAR	7mg/L
MS=Murashige y Skoog	

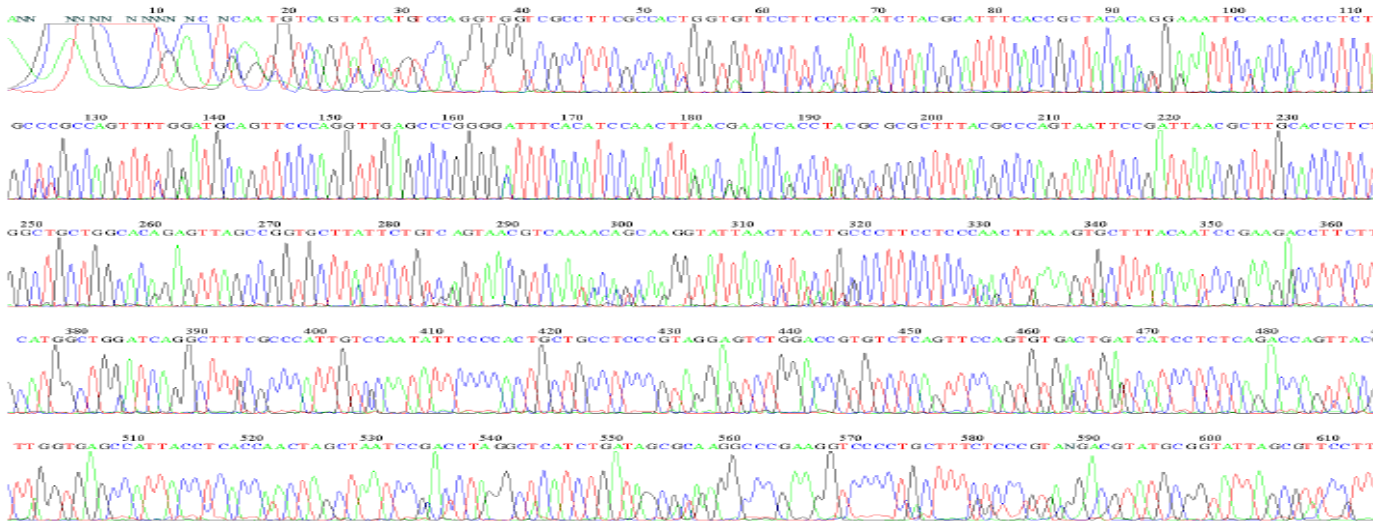
Tabla 7. Medio de cultivo para la fase de multiplicación.

MURASHIGE Y SKOOG(1962)	
MACRONUTRIENTES	UNICAS
MICRONUTRIENTES	UNICAS
VITAMINAS	
Inositol	100mg
Tiamina	100µg/L
Piridoxina	500µg/L
AMINOACIDOS	
Glycina	2mg/L
REG. CRECIMIENTO	
BAP	5 mg/L
ANA	0.5 mg/L
OTROS	
Ph	5.8
AZUCAR	40mg/L
AGAR	7mg/L
MS=Murashige y Skoog	

Tabla 8. Medio de cultivo para la fase de enraizamiento.

MURASHIGE Y SKOOG(1962)	
MACRONUTRIENTES	UNICAS
MICRONUTRIENTES	UNICAS
VITAMINAS	
Inositol	100mg
Tiamina	100µg/L
Piridoxina	500µg/L
AMINOACIDOS	
Glycina	2mg/L
REG. CRECIMIENTO	
IBA	0.5 mg/L
ANA	0.5 mg/L
OTROS	
Ph	5.8
AZUCAR	30mg/L
AGAR	7mg/L
MS=Murashige y Skoog	

File: CBLB12_16SrRNAR800.ab1 Run Ended: 2015/7/7 21:33:44 Signal G:1281 A:1133 C:1725 T:1411
Sample: CBLB12_16SrRNAR800 Lane: 70 Base spacing: 15.066009 766 bases in 9236 scans Page 1 of 2



File: CBLB12_16SrRNAR800.ab1 Run Ended: 2015/7/7 21:33:44 Signal G:1281 A:1133 C:1725 T:1411
Sample: CBLB12_16SrRNAR800 Lane: 70 Base spacing: 15.066009 766 bases in 9236 scans Page 2 of 2

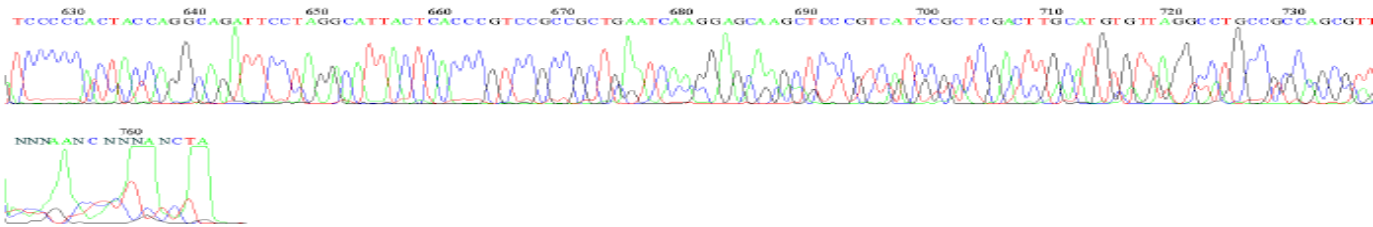


Figura 33. Resultados de la secuenciación de las bacterias.