BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad San Pablo-CEU

Estudio de la capacidad de dos cepas bacterianas del género "Bacillus" para promover el crecimiento vegetal.

Beatriz Ramos Solano

Tesis de Doctorado

Facultad: Ciencias Experimentales y Técnicas

Director: Dr. F.J. Gutiérrez Mañero

2000

UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU
FACULTAD DE CC. EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DOS CEPAS BACTERIANAS DEL GÉNERO *Bacillus* PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL

TESIS DOCTORAL

Beatriz Ramos Solano

1999

UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU

FACULTAD DE CC. EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DOS CEPAS BACTERIANAS DEL GÉNERO *Bacillus* PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO VEGETAL

Memoria presentada por Dª. Beatriz Ramos Solano

para optar al grado de Doctor

Beatriz Ramos Solano

VºBº del Director

F.J.Gutiérrez Mañero

Madrid, 1999

AGRADECIMIENTOS

Esta Memoria ha sido realizada en los laboratorios de la Universidad San Pablo CEU, por lo que quiero agradecer las facilidades que me ha brindado para llevarlo a cabo.

Gracias, en primer lugar, a Javier Gutiérrez Mañero, Maestro y Amigo, por su paciencia, por su comprensión, por confiar en mí desde el primer momento y a pesar de mis torpezas y mi mala cabeza, asumiendo y remediando cosas que no tenían remedio. Por todo lo que he aprendido a su lado, tanto en el saber científico como en la actitud ante lo cotidiano de la vida y el trabajo, la resolución de problemas y el trato con la gente que nos rodea. Sirvan estas líneas como un pequeño resumen de toda mi gratitud, y enhorabuena porque, a pesar de los pesares, hemos conseguido terminar este trabajo. Gracias.

Gracias a Marisa, por haber empezado la primera parte de este trabajo experimental en un momento en que me era imposible y había que hacerlo. Gracias por estar ahí siempre y por los buenos y malos ratos que hemos pasado. A Lucas, compañero de despacho, colmo del desorden y la entropía, de la bondad y la diplomacia; gracias por tu apoyo, sobre todo en estos últimos momentos y a pesar de la distancia. A Nuria, Agustín, María, Jose Luis y Juanjo, gracias por estar disponibles siempre para apagar el compresor, servir unas placas de agar, resolver un "pequeño problema informático" evitando que me cortara las venas en un arranque de desesperación, o terminar cualquier cosa que tuviera entre manos cuando no me daba tiempo a terminarla, lo que ocurría con demasiada frecuencia. Gracias por vuestra paciencia ante mis arranques de genio y mal humor, prometo no hacerlo más, o por lo menos, intentarlo.

Gracias a Carmina, por los ratos de desahogo, buenos y malos, que hemos pasado juntas; espero que podamos seguir haciéndolo. A Pozuelo, por ser siempre tan cariñoso y optimista. A Emilio, por haber confiado en mí y haber tenido paciencia esperando que llegara este momento, que, aunque tarde, ha llegado. Gracias.

Gracias a Jose Alfredo, por estar siempre ahí, y al final, lleno de paciencia dejarme su scanner y enseñarme a usarlo. Gracias a Antonio, Raquel (de Botánica), Raquel (de cultivos), Raquel (de "Para"), a Loli, a Fernando, y a todas las "Paras" por su paciencia las innumerables veces que he centrifugado en sus instalaciones. A Pepe y Paloma, por esas limosnitas de antibióticos, solicitadas siempre con prisas y promesas de devolución inmediata; la intención es buena, pero ¿por qué hacen los días tan cortos?. A Coral y Toñi, por su paciencia con la electroforesis capilar explicando el manejo del aparato, la interpretación de los resultados y cualquier duda absurda y básica de cromatografía. A Maribel, por sus buenas intenciones de

escribirme los agradecimientos y el resto de la tesis. A todos los que os he pedido algo, que como sois tantos, seguro que me olvido de alguno, muchas gracias por vuestra ayuda.

Al personal de administración y servicios, Rosa, Miguel Angel, Sonia, Susana, Susana, Fernando, Quique, Ismael, Goyo, Angel, Pedro, Manolo, Guillermo, Alejandro, y todos los demás, por facilitar fondos, fotocopias, material de papelería, arreglar cosas varias, "fabricar" bombonas de nitrógeno en momentos imprevistos, facilitar cualquier trámite administrativo y demás funciones no escritas pero realizadas.

Gracias a las señoras de la limpieza, por hacer posible el trabajo después de un muestreo, y a diario, por recoger los restos de nuestro febril y alocado trabajo. Gracias a los miembros del servicio de seguridad, Juan Carlos, Montes y demás, por dejarme las llaves de todos los edificios a las horas más intempestivas y avisarnos de los fallos eléctricos en los momentos más inoportunos: los domingos y las vacaciones.

Gracias anticipadas a los miembros del Tribunal por el tiempo dedicado a leer esta Memoria; espero que no haya resultado demasiado tediosa.

Gracias a mi familia, padres y hermanos, por recoger a Paco cuando me ha hecho falta; a mi Abuela y a la madre de Francis, por rezar tantas veces por nosotros; a toda la familia de Francis y a todos vosotros, gracias por vuestro apoyo constante. Gracias a mis amigas Carmen, Teresa y Paula, sus maridos y madres, que a pesar de la duración de este trabajo, no han parado de interesarse en él durante todo este tiempo. Gracias a todos por vuestro apoyo, a pesar de no entender nada de la ciencia, lo que no es necesario para comprender la necesidad de apoyo humano en los momentos más grises.

Por último, gracias a mi marido por su apoyo constante, su paciencia, su colaboración en las gráficas, correcciones y demás colaboración en la elaboración de esta Memoria.

Gracias a todos.

ABREVIATURAS

PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant growth promoting rhizobacteria)

DRB: Rizobacterias deletéreas (Deleterious rhizobacteria)

YIB: Bacterias que incrementan el rendimiento (Yield increasing bacteria)

PLFA: Acidos grasos procedentes de fosfolípidos (phospholipid fatty acid analysis)

ANOVA: Análisis de la varianza

LSD: Mínima diferencia significativa

ACP: Análisis de componentes principales

CIC: Capacidad de intercambio catiónico

GC-MS: Cromatografía de gases- espectrofotometría de masas

GA: Giberelinas

MeTMSi: Trimetil-silil derivados

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1.Efecto de la planta sobre el sistema edáfico 3

1.1.1. Factores que afectan a la exudación radical..... 6

1.1.2. Composición de los exudados..... 7

1.2. Efecto del sistema edáfico sobre la planta..... 9

1.2.1. Factores abióticos..... 9

1.2.2. Factores bióticos..... 11

1.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) 14

1.3.1. Mecanismos de acción..... 15

1.3.1.1. Mecanismos indirectos..... 15

1.3.1.2. Mecanismos directos..... 18

1.3.2. Giberelinas..... 19

1.3.3. Colonización..... 22

1.4. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. 24

1.5. *Pinus pinea*..... 24

1.6. Plan de trabajo y objetivos..... 25

2. MATERIALES Y MÉTODOS..... 27

2.1. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* (L.) Gaertn. Con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en condiciones de laboratorio..... 30

2.1.1.Procedencia de las semillas empleadas en las experiencias..... 30

2.1.2.Recogida y caracterización de los suelos empleados en el experimento..... 30

2.1.3.Obtención y condiciones de crecimiento de plántulas de *A. glutinosa*. Ensayos de inoculación. Recogida y preparación de muestras..... 30

2.1.4. Monitorización de las inoculaciones por el perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos..... 34

2.1.4.1. Extracción de lípidos totales..... 34

2.1.4.2. Fraccionamiento..... 35

2.1.4.3. Metanolisis alcalina..... 35

2.1.4.4. Nomenclatura de los ácidos grasos..... 36

2.1.5. Análisis biométricos de las plantas..... 36

2.1.6. Tratamiento de la información..... 36

2.1.6.1. Tratamiento de la información del análisis de ácidos grasos..... 36
2.1.6.2. Tratamiento de la información del análisis biométrico..... 36
2.2. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *Alnus glutinosa* y *Pinus pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en invernadero..... 37
2.2.1.Procedencia de las semillas empleadas..... 37
2.2.2.Caracterización del sustrato empleado..... 37
2.2.3.Obtención y condiciones de crecimiento de plántulas de *A. glutinosa* y *P. Pinea*. Ensayo de inoculación. Recogida y preparación de muestras..... 37
2.2.4. Monitorización de las inoculaciones..... 40
2.2.5. Análisis biométricos de las plantas..... 40
2.2.6. Tratamiento de la información..... 40
2.2.6.1. Tratamiento de la información del análisis de ácidos grasos..... 40
2.2.6.2. Tratamiento de la información del análisis biométrico..... 40
2.3. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus* y *B.licheniformis* sobre la exudación radical y su incidencia en las características fisicoquímicas edáficas..... 41
2.3.1. Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos de *A. glutinosa*..... 41
2.3.1.a. Medida del pH..... 41
2.3.1.b. Determinación de nitrógeno amonio..... 41
2.3.1.c. Determinación de nitrógeno nitrato..... 42
2.3.1.d. Determinación de nitrógeno total..... 42
2.3.1.e. Determinación de carbono orgánico..... 42
2.3.1.f. Deteminación de la capacidad de intercambio catiónico CIC..... 43
2.3.1.g. Determinación de la textura..... 43
2.3.1.h. Determinación de la capacidad de retención máxima CRM..... 43
2.3.2. Obtención y caracterización de los exudados..... 44
2.3.2.1.Obtención de los exudados..... 44
2.3.2.2.Caracterización de los exudados..... 44
2.3.2.2.1. Análisis fisicoquímicos..... 45
2.3.2.2.1.a. Medida del pH..... 45
2.3.2.2.1.b. Determinación de nitrógeno amonio..... 45
2.3.2.2.1.c. Determinación de nitrógeno nitrato..... 45
2.3.2.2.1.d. Determinación de nitrógeno total..... 45
2.3.2.2.1.e. Determinación de carbono orgánico..... 45
2.3.2.2.2. Análisis bioquímicos..... 46
2.3.2.2.2.a. Determinación de azúcares..... 46

2.3.2.2.2.b. Determinación de proteínas..... 46
2.3.2.2.2.c. Determinación de lípidos..... 46
2.3.3. Tratamiento de la información..... 47
2.3.3.1. Tratamiento de los resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos..... 47
2.3.3.2. Tratamiento de los resultados de la caracterización de exudados. 47
2.4. Materiales y métodos empleados en la caracterización de giberelinas producidas por las cepas de *B. pumilus* y *B. licheniformis*..... 48
2.4.1. Pruebas biológicas..... 48
2.4.2. Tratamiento de la información..... 49
2.4.3. Caracterización de giberelinas por GC-MS..... 49
2.4.3.1. Purificación..... 49
2.4.3.2. Metilación..... 50
2.4.3.3. Sililación..... 51
2.4.3.4. Identificación de GAs..... 51
2.4.4. Cuantificación de GAs..... 51

3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Y *Pinus pinea* CON *B. pumilus* y *B. licheniformis*..... 53
3.1. Resultados obtenidos en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en condiciones de laboratorio..... 54
3.1.1. Monitorización de las inoculaciones mediante el perfil de fosfolípidos de membrana (PLFAs) 54
3.1.1.1. Resultados de la ordenación mediante ACP de los perfiles de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa* en los suelos A y B, inoculados con *B. pumilus* y *B. licheniformis*..... 54
3.1.1.1.a. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus*..... 55
3.1.1.1.b. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. licheniformis*..... 58
3.1.1.2. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa*, inoculada con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, en el suelo A..... 62
3.1.1.2.a. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus*..... 62
3.1.1.2.b. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. licheniformis*..... 67
3.1.1.3. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa*, inoculada con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, en el suelo B..... 71
3.1.1.3.a. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus*..... 71
3.1.1.3.b. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. licheniformis*..... 74

3.1.2. Resultados del efecto de la inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus* y *B.licheniformis* sobre el crecimiento..... 79
3.1.2.1. Inoculación de *A. glutinosa* en el suelo A..... 79
3.1.2.2. Inoculación de *A. glutinosa* en el suelo B..... 81
3.2. Resultados obtenidos en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* y *P. pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en invernadero..... 87
3.2.1. Monitorización de las inoculaciones mediante análisis del perfil de fosfolípidos de membrana (PLFAs) 87
3.2.1.1. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *A. glutinosa* inoculada con *B. pumilus* o *B. licheniformis* en turba-arena..... 87
3.2.1.1.a. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus*..... 87
3.2.1.1.b. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. licheniformis*..... 91
3.2.1.2. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *P. pinea* inoculada con *B. pumilus* o *B. licheniformis* en turba-arena..... 95
3.2.2. Resultados del efecto de la inoculación de *A. glutinosa* y *P. Pinea* con *B. pumilus* o *B. licheniformis* sobre el crecimiento..... 98
3.2.2.1. Inoculación de *A. glutinosa*..... 98
3.2.2.2. Inoculación de *P. pinea*..... 100

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *A. glutinosa* (L.) Gaertn. Y *P. Pinea* CON *B. pumilus* Y *B. licheniformis* 103

5. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *A. glutinosa* CON *B. pumilus* Y *B. licheniformis* SOBRE LA EXUDACIÓN RADICAL Y SOBRE CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SISTEMA RIZOSFÉRICO 117
5.1. Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en los suelos A y B..... 118
5.1.1. Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en suelo A..... 118
5.1.2. Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en suelo B..... 119
5.2. Caracterización de los exudados recogidos de plántulas inoculadas y no inoculadas crecidas en los suelos A y B..... 121
5.2.1. Exudados recogidos de plántulas crecidas en suelo A..... 121
5.2.2. Exudados recogidos de plántulas crecidas en suelo B..... 123

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *A. glutinosa* CON *B. pumilus* Y *B. licheniformis* SOBRE LA EXUDACIÓN RADICAL Y SU INCIDENCIA EN CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SISTEMA RIZOSFÉRICO..... 126

7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GIBERELINAS POR *B. pumilus* Y *B. licheniformis*..... 131

7.1. Pruebas biológicas..... 132

7.2. Determinación de giberelinas por GC-MS..... 142

8. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GIBERELINAS POR *B. pumilus* Y *B. licheniformis*..... 146

9. CONCLUSIONES..... 153

10. BIBLIOGRAFÍA..... 155

11. APÉNDICES..... 168

Apéndice 1..... 169

Apéndice 2..... 186

Apéndice A..... 192

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.I. Composición de los exudados radicales 7
Tabla 1.II. Mecanismos de acción directa de las PGPRs..... 18
Tabla 3.I. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas I y V, apéndice 1) 55
Tabla 3.II. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas I y V, apéndice 1) 56
Tabla 3.III. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas II y VI, apéndice 1) 57
Tabla 3.IV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas II y VI, apéndice 1) 58
Tabla 3.V. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas III y VII, apéndice 1) 59
Tabla 3.VI. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas III y VII, apéndice 1)) 60
Tabla 3.VII. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas IV y VIII, apéndice 1) 61
Tabla 3.VIII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) de los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tablas IV y VIII, apéndice 1) 62
Tabla 3.IX. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla I, apéndice 1)..... 63
Tabla 3.X. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelos A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla I, apéndice 1)..... 64

Tabla 3.XI. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla II, apéndice 1) 65
Tabla 3.XII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla II, apéndice 1) 66
Tabla 3.XIII. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla III, apéndice 1) 67
Tabla 3.XIV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelos A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla III, apéndice 1) 68
Tabla 3.XV. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla IV, apéndice 1) 69
Tabla 3.XVI. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla IV, apéndice 1) 70
Tabla 3.XVII. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla V, apéndice 1)..... 72
Tabla 3.XVIII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelos B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla V, apéndice 1)..... 72
Tabla 3.XIX. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla VI, apéndice 1) 73
Tabla 3.XX. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) del suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla VI, apéndice 1) 74
Tabla 3.XXI. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla VII, apéndice 1) 75

Tabla 3.XXII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelos B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla VII, apéndice 1) 76
Tabla 3.XXIII. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla VIII, apéndice 1) 77
Tabla 3.XXIV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes correspondientes al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control) del suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla VIII, apéndice 1) 78
Tabla 3.XXV. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, porcedente de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XVII, apéndice 1)..... 88
Tabla 3.XXVI. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, porcedente de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XVII, apéndice 1) 89
Tabla 3.XXVII. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas cultivables, procedente de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* o no inoculadas, en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XVIII, apéndice 1) 90
Tabla 3.XXVIII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas cultivables, procedente de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* o no inoculadas en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XVIII, apéndice 1) 91
Tabla 3.XXIX. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* o no inoculadas, en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XIX, apéndice 1) 92
Tabla 3.XXX. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* o no inoculadas en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XIX, apéndice 1)..... 93
Tabla 3.XXXI. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* o no inoculadas, en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XX, apéndice 1) 94
Tabla 3.XXXII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* o no inoculadas en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XX, apéndice 1)..... 95

Tabla 3.XXXIII. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos primeros ejes correspondiente al ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* o no inoculadas, en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XXI, apéndice 1) 96
Tabla 3.XXXIV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* o no inoculadas en los tres tiempos de muestreo, crecidas en turba arena (Tabla XXI, apéndice 1) 97

Tabla 5.I. Resultados de la caracterización fisicoquímica de los suelos rizosféricos procedentes de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas crecidas en el suelo A. 118
Tabla 5.II. Resultados de la caracterización fisicoquímica de los suelos rizosféricos procedentes de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas crecidas en el suelo B. 119
Tabla 5.III. Resultados de la caracterización de los exudados extraídos de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, y no inoculadas, crecidas en el suelo A..... 121
Tabla 5.IV. Resultados de la caracterización de los exudados extraídos de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, y no inoculadas, crecidas en el suelo B..... 123

Tabla 7.I. Resultados de longitud aérea de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 132
Tabla 7.II. Significación de las diferencias según el LSD, correspondiente a los resultados de la tabla 7.I. 133
Tabla 7.III. Resultados de longitud del brote de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 136
Tabla 7.IV. Significación de las diferencias según el LSD, correspondiente a los resultados de la tabla 7.III. 136
Tabla 7.V. Resultados de superficie aérea del brote de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 138
Tabla 7.VI. Resultados de superficie aérea total de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 140
Tabla 7.VII. Resultados de número de hojas en los brotes de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 140
Tabla 7.VIII. Significación de las diferencias según el LSD, correspondiente a los resultados de la tabla 7.VII. 141
Tabla 7.IX. Resultados de superficie radical de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 141
Tabla 7.X. Resultados de longitud radical de plantas enanas tratadas con GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* concentrados x10, x20, x40 y x80. 141
Tabla 7.XI. Identificación de los MeTMSi derivados de las Gas mediante el análisis combinado de cromatografía de gases, espectrometría de masas en el medio de cultivo de *B. pumilus*..... 142
Tabla 7.XII. Identificación de los MeTMSi derivados de las Gas mediante el análisis combinado de cromatografía de gases, espectrometría de masas en el medio de cultivo de *B. licheniformis*..... 142

Tabla 7.XIII. Cuantificación de las giberelinas presentes en los medios de cultivo bacterianos de *B. pumilus* y *B. licheniformis* 145

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Trilogía del suelo..... 3

Figura 2.1. Protocolo general de trabajo seguido para la toma de muestras. Estudios de colonización y ensayos biológicos..... 29
Figura 2.2. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de laboratorio..... 33
Figura 2.3. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de invernadero..... 39
Figura 2.4. Protocolo de obtención y caracterización de exudados..... 44

Figura 3.1. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Pumilus* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 55
Figura 3.2. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 57
Figura 3.3. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 59
Figura 3.4. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 61
Figura 3.5. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Pumilus* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 63
Figura 3.6. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 65
Figura 3.7. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 67
Figura 3.8. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 69
Figura 3.9. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Pumilus* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 71
Figura 3.10. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 73

Figura 3.11. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 75
Figura 3.12. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 77
Figura 3.13. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 79
Figura 3.14. Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo 80
Figura 3.15. Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 81
Figura 3.16. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo..... 81
Figura 3.17. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 82
Figura 3.18. Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo 83
Figura 3.19. Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 85
Figura 3.20. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo..... 86
Figura 3.21. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Pumilus* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 88
Figura 3.22. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 90
Figura 3.23. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. Licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 92
Figura 3.24. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 94
Figura 3.25. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *P. pinea*, inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 96
Figura 3.26. Resultados de longitud aérea de las plantas de *A. glutinosa* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 98
Figura 3.27. Resultados de superficie aérea de las plantas de *A. glutinosa* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 99

Figura 3.28. Resultados de longitud radical de las plantas de *A. glutinosa* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 99
Figura 3.29. Resultados de superficie radical de las plantas de *A. glutinosa* inoculadas con *B. Pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 100
Figura 3.30. Resultados de longitud aérea de las plantas de *P. pinea* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 101
Figura 3.31. Resultados de superficie aérea de las plantas de *P. pinea* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 101
Figura 3.32. Resultados de longitud radical de las plantas de *P. pinea* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 102
Figura 3.33. Resultados de superficie radical de las plantas de *P. pinea* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en turba arena, en los 3 tiempos de muestreo..... 102

Figura 5.1. Representación de la separación cromatográfica de lípidos extraídos de exudados de plantas crecidas en el suelo A, no inoculadas e inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* en T0 y T1..... 122
Figura 5.2. Representación de la separación cromatográfica de lípidos extraídos de exudados de plantas crecidas en el suelo A, no inoculadas e inoculadas con *B. pumilus* o *B. Licheniformis* en T2 y T3..... 123
Figura 5.3. Representación de la separación cromatográfica de lípidos extraídos de exudados de plantas crecidas en el suelo B, no inoculadas e inoculadas con *B. pumilus* en los 4 tiempos de muestreo..... 125
Figura 5.4. Representación de la separación cromatográfica de lípidos extraídos de exudados de plantas crecidas en el suelo B, no inoculadas e inoculadas con *B. Licheniformis* en los 4 tiempos de muestreo..... 125

Figura 7.1. Fotografía de las plantas enanizadas a las que se les aplicó el medio de cultivo de *B. pumilus* 10 y 80 veces concentrado, junto a las plantas control..... 133
Figura 7.2. Fotografía de las plantas enanizadas a las que se les aplicó el medio de cultivo de *B. licheniformis* 10 y 80 veces concentrado, junto a las plantas control 134
Figura 7.3. Representación de las rectas de regresión realizadas con los resultados de longitud aérea correspondientes al tratamiento con distintas concentraciones de GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* 10, 20, 40 y 80 veces concentrados..... 135
Figura 7.4. Representación de las rectas de regresión realizadas con los resultados de longitud aérea del brote correspondiente al tratamiento con distintas concentraciones de GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* 10, 20, 40 y 80 veces concentrados..... 137
Figura 7.5. Representación de las rectas de regresión realizadas con los resultados de superficie aérea del brote, correspondiente al tratamiento con distintas concentraciones de GA_3 (5, 20 y 40 ppm) y los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis* 10, 20, 40 y 80 veces concentrados..... 139
Figura 7.6. Espectro de masas correspondiente a MeTMSi-GA_1 de una muestra de medio de cultivo de *B. pumilus*..... 143
Figura 7.7. Cromatograma de masas de la corriente iónica producida por los iones 506 y 508 seleccionados para la cuantificación de GA_1 en la fracción 17-19 de un extracto de medio de cultivo de *B. pumilus* 144

1. INTRODUCCIÓN

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

La problemática ambiental contemporánea ha generado la necesidad de poner a punto nuevos métodos que permitan incrementar los rendimientos agrícolas y forestales, junto con el desarrollo de una agricultura y silvicultura sostenibles (Swaminathan, 1991).

La reducción progresiva del uso de fertilizantes y pesticidas solamente es posible mediante el empleo de Tecnologías Limpias, las cuales incluyen el uso de plantas mejoradas genéticamente y de biofertilizantes. Este último método, que consiste en el uso de inóculos fúngicos y bacterianos sobre el sustrato edáfico en el que se desarrollan las plantas, o sobre las semillas antes de la siembra, constituye uno de los sistemas biotecnológicos con más futuro para la mejora de la producción vegetal, evitando los efectos secundarios de los métodos actuales de fertilización y protección frente a plagas. Las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) pueden utilizarse como agentes protectores frente a diversos patógenos (Lamanceau y Alabouvette, 1993; Cook, 1993); fertilizadores del suelo gracias a su capacidad para movilizar nutrientes (Zhoinska *et al*., 1992); productores de fitohormonas que modifican la fisiología de las plantas, permitiendo optimizar los procesos de floración, germinación y establecimiento de la plántula (Schippers *et al*., 1995; Probanza *et al*., 1996; Gutierrez Mañero *et al*., 1996), por su efecto sobre el establecimiento de simbiosis, proceso de extrema importancia ecológica, como son las establecidas por *Frankia* con plantas no leguminosas, y en la alimentación humana, como las establecidas entre *Rhizobium-Bradyrhizobium* con leguminosas (Defreitas *et al*., 1993; Andreeva *et al*., 1993; Probanza *et al.*, 1997).

La prometedora perspectiva del uso de PGPRs en cualquiera de sus aplicaciones exige un profundo estudio del comportamiento de los inóculos en condiciones controladas. Los ensayos previos a los experimentos de campo son absolutamente necesarios antes de su aplicación a gran escala. La literatura (Gilbert *et al*., 1993) revela la imperiosa necesidad de conocer el impacto del inóculo en las comunidades microbianas rizosféricas y en su estructura, así como su posterior evolución en el tiempo con respecto a la comunidad original. Así mismo, se debe comprobar que el efecto promotor del crecimiento demostrado sobre la planta en condiciones axénicas se mantiene en presencia de otros microorganismos, en otros sustratos, en distintas condiciones ambientales, y si este efecto es extensible a otras especies vegetales. En este sentido, existen numerosos estudios (Shishido *et al*., 1995; Eneback *et al.*, 1997) en los que se testan bacterias que son promotoras del crecimiento de una determinada especie vegetal sobre otras especies, y no siempre son capaces de promover el crecimiento (Bashan *et al*., 1993). Por último, se debe considerar el efecto de la inoculación sobre la exudación radical y su influencia sobre la rizosfera, tanto sobre los componentes bióticos como sobre los componentes físicos y químicos del ambiente radical (Lynch, 1987).

Este nuevo enfoque de la agricultura, en el que los biofertilizantes aparecen como una alternativa a los manejos clásicos en base a criterios medioambientales, potencia los estudios de sobre bacterias PGPRs naturales, estudios que pueden abordarse desde distintos puntos de vista. Independientemente de cómo se seleccionen, las cepas potencialmente identificadas como PGPRs deberán demostrar su capacidad promotora del crecimiento en varias etapas, en primer lugar en condiciones axénicas, en el laboratorio, y después, demostrarlo en experiencias de campo, en competencia con otros microorganismos. En esta etapa, la fase más determinante es la colonización con éxito de la rizosfera, etapa en la que la planta ejercerá un control, seleccionando a aquellas cepas que le proporcionen más ventajas, como sintetizar factores de crecimiento o movilizar nutrientes no disponibles para estas plantas (Jones *et al.*, 1994), y además coexistirá con otras bacterias, con las que deberá establecer una relación.

En resumen, se aborda una vez más otro estudio de la triple interacción planta-suelo-microorganismo, definida por Lynch como la trilogía del suelo (Figura 1.1.) (Lynch, 1990)

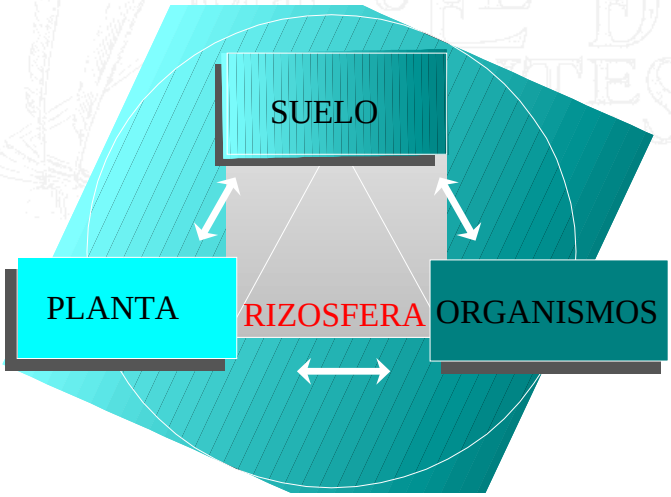


Figura 1.1. Trilogía del suelo (Lynch, 1990)

1.1. Efecto de la planta sobre el sistema edáfico

Las plantas modifican las comunidades microbianas del suelo de un modo fundamental (Remacle y De Leval, 1975; Acero *et al.*, 1994). Alexander (1980) observa cómo diferentes especies de plantas en un mismo tipo de suelo presentan rizosferas muy diversas, mientras que la rizosfera de una misma especie cultivada en suelos muy diferentes, varía muy poco.

Turner y Frantz (1985) señalan que el efecto de la vegetación sobre el suelo y las comunidades microbianas ocurre por vía aérea y por vía radical.

El efecto vía aérea puede ocurrir por el lavado de las partes aéreas por la lluvia, por la adición de materia orgánica al suelo a través del lecho de hojarasca, y por la formación de microclimas debida al efecto dosel.

El lavado de las partes aéreas aporta diferentes compuestos orgánicos y arrastra nutrientes hacia el suelo. Bollen y Lu (1968) observan que el agua que ha lavado las partes aéreas del aliso, contiene de 2 a 10 veces más nitrógeno que la caída a cierta distancia de la betulácea.

La adición de materia orgánica al suelo a través del lecho de hojarasca influye en las propiedades del mismo y por lo tanto en el sistema suelo-planta, siendo fundamental en el mantenimiento y mejora de la calidad del suelo (Reeves, 1997). Su riqueza en materia orgánica viene determinada por el aporte de materiales orgánicos y la descomposición microbiana. La vía de entrada de materia orgánica vegetal al suelo más importante la constituyen los restos y deshechos vegetales de todo tipo: hojas (principalmente), ramas, raíces y productos de lavado de las hojas (Tiessen *et al.,* 1984). La estructura y composición del lecho de hojarasca regulan la tasa de mineralización, por lo que incide de forma decisiva en la producción primaria de los ecosistemas (Hunt *et al.,* 1988; Priha y Smolander, 1997). Los restos de coníferas se descomponen lentamente, ya que contienen una baja proporción de nitrógeno y fósforo (Cowling y Merril, 1966). Lo contrario sucede con los restos de plantas arbóreas y arbustivas fijadoras de nitrógeno.

Por último, se ha demostrado la formación de microclimas por efecto dosel. Diversos estudios de campo (Bermúdez de Castro y Gutiérrez Mañero, 1983; Pozuelo González *et al*., 1995; Llinares, 1990) demuestran cómo las condiciones climáticas adversas son amortiguadas por el efecto dosel, al menos en parte. En este sentido, los autores citados encuentran mayores densidades de microorganismos heterótrofos y mayores actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos del nitrógeno y del carbono bajo la zona de protección de especies arbóreas.

El aporte de materia orgánica vía exudación es uno de los más importantes tanto en cantidad como en calidad. Los compuestos orgánicos liberados por las raíces (exudados o rizodeposiciones) se pueden dividir en dos grandes grupos (Jones, 1997), dependiendo de su tamaño: los de bajo peso molecular, que se liberan a favor de gradiente de concentración, y los de elevado peso molecular, que se liberan por mecanismos de transporte activo o por lisis celulares.

Es difícil distinguir entre los distintos tipos de exudados mencionados, por lo que Uren y Reisenauer (1988) y Rovira (1969) consideran exudados a todas las sustancias orgánicas liberadas por la raíz. La exudación radical se produce, sobre todo, en las uniones longitudinales de las células (Bowen, 1979).

Entre los de bajo peso molecular encontramos ácidos orgánicos, azúcares, fenoles y aminoácidos (incluyendo fitosideróforos) y gases, como etileno, CO_2 y HCN (Rovira, 1973). Tanto la

cantidad como las proporciones varían entre plantas. La fracción de elevado peso molecular incluye los lisados, procedentes de la autolisis de células epidérmicas y corticales (Bowen y Rovira, 1991), las secreciones, que implican un proceso metabólico de liberación, y pueden hacerlo en contra de gradiente de potencial electroquímico (Hale *et al*, 1978), y los mucílagos. Los mucílagos son sustancias gelatinosas de alto peso molecular (Watt *et al*, 1993) que recubren la superficie radical. La producción de estos compuestos está positivamente relacionada con el crecimiento de la raíz (Trolldenier y Hecht-Buchholz, 1984). Cuando este mucílago se forma en condiciones no axénicas es el resultado de la actividad de la planta y los microorganismos, formando junto con las partículas del suelo una sustancia llamada mucigel (Bowen y Rovira, 1991).

Este mucigel está implicado en varias funciones biológicas (Ray *et al.*, 1988) como son la proteger las zonas apicales de la raíz frente a la desecación; facilitar la penetración de la raíz en crecimiento por el suelo, especialmente en suelos secos; participa también en la absorción de iones, bien facilitando o impidiendo el proceso, interaccionando con las partículas del suelo, mejorando el contacto de la raíz con el suelo, y provocando la formación de agregados en la rizosfera. En ciertas condiciones, el estrecho contacto entre las partículas del suelo y la superficie radical, vía mucílago, juegan un papel clave en la absorción de nutrientes minerales, especialmente en el caso de micronutrientes y fósforo, y también para los tóxicos, metales pesados y aluminio. En el caso del fósforo, Matar *et al.* (1967) demostraron que en un suelo deficiente en este elemento las plantas eran capaces de absorberlo, probablemente debido a que se movilizaba en la interfase suelo-raíz gracias al ácido poligalacturónico del mucigel, que era capaz de liberarlo de la superficie de las arcillas (Nagarajah, *et al.*, 1970). En el caso del hierro, la absorción por parte de la planta en suelos deficientes en este micronutriente se ve estimulada por la liberación de fitosideróforos en los exudados (Jones, 1997). Por último, los mucílagos que componen el mucigel tienen una elevada capacidad de acomplejar cationes de metales pesados (Pb^{+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}), intercambiándolos con Ca^{2+} principalmente (Morel *et al.*, 1986).

La liberación de compuestos orgánicos por las raíces tiene una influencia decisiva sobre la disponibilidad de nutrientes y en consecuencia sobre la actividad microbiana (Bowen y Rovira, 1991). Además de sustrato para las bacterias, estos compuestos tienen capacidad de quelar cationes (Vaughan *et al.*, 1993) y formar agregados edáficos (Forster, 1990), definiendo la estructura del suelo.

El crecimiento microbiano está limitado por la disponibilidad de carbono orgánico, su aporte por los exudados radicales y las bajas concentraciones de O_2 favorecen la actividad y el crecimiento de las bacterias (HΦjberg *et al.*, 1996). Las raíces en crecimiento, por lo tanto, son una fuente vital de carbono para la biomasa microbiana (Whipps y Lynch, 1986; Wheatley *et al.*, 1990).

Como resultado de todo ello, la rizosfera es rica en microorganismos; Paul y Clark (1989) estiman que la densidad microbiana es 100 veces superior que fuera de ella, lo que se debe a la mayor

actividad microbiana en la rizosfera. Esta diferencia de actividad queda reflejada en los estudios de Norton y Firestone (1991), que detectan cambios muy acusados de diversidad entre el suelo rizosférico y no rizosférico.

1.1.1. Factores que afectan a la exudación radical

Edad de la planta, especie, estado fisiológico y grado de lignificación del aparato radical son factores que afectan decisivamente a la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales (Lynch, 1990; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1995) y, por lo tanto, son factores que influyen en el funcionamiento de la rizosfera. Así, el tipo de proteínas (Juo y Stotzky, 1970) o de carbohidratos (Hamlen *et al.*, 1972) exudados por las herbáceas depende de la edad de la planta, efecto que también se han detectado en leñosas (Smith, 1970). Las plantas perennes suelen exudar una mayor proporción de fotosintetizados (40-73 %) que las anuales (10-46 %) (Lynch y Whipps, 1990). Esto puede ser debido a que las plantas perennes utilizan parte de estos exudados para sobrevivir a lo largo del año en muy diversas condiciones de estrés (Harris *et al.*, 1980).

Otros factores que influyen en las pautas de exudación son intensidad de la luz y fotoperiodo, temperatura y estrés hídrico. En general, las situaciones de estrés estimulan la exudación. Por ejemplo, las agresiones mecánicas, anaerobiosis, sequía y deficiencia de nutrientes minerales (Lynch y Whipps, 1990). El estrés hídrico es uno de los factores que más inducen la exudación radical (Curl y Truelove, 1986; Whipps, 1990), debido al incremento de la presión osmótica del medio y a la necrosis radical unido a que la presencia de microorganismos estimula la rizodeposición (Meharg y Killham, 1991) especialmente la fracción de bajo peso molecular (Kloss *et al.*, 1984). Barber y Martin (1976) demostraron que las raíces de trigo liberan entre un 7-13 % de fotosintetizados creciendo en ausencia de rizobacterias y entre un 18-25 % cuando existen microorganismos rizosféricos. En consecuencia, el número total de bacterias suele ser mayor en suelos que han sufrido un período de estrés (Martin, 1977).

El estrés hídrico también influye en la liberación de nutrientes asimilables por procesos puramente físicos, estimulando la actividad microbiana, fundamentalmente la mineralización (Walworth, 1992), lo que afecta decisivamente a la planta.

Las bacterias son más eficaces que los hongos utilizando los compuestos de peso molecular bajo. Por el contrario, los hongos metabolizan fácilmente los polímeros de peso molecular elevado, que son más abundantes en los restos vegetales y, por tanto, más eficaces durante el comienzo de la descomposición de las raíces muertas (Nakas y Klein, 1980). Tales características metabólicas justifican que las bacterias dependan, sobre todo, de los exudados radicales, y los hongos, de los restos vegetales en descomposición.

Lee y Pankurst (1992) estiman que el 30-40 % de la materia orgánica que entra en el suelo lo hace por exudación. El significado biológico de esta desmesurada "pérdida" de energía por parte las plantas sólo se puede entender desde la óptica de un hecho común en multitud de sistemas naturales: la relación inversión-costo-beneficio: la liberación de compuestos orgánicos, vía exudación, permite el desarrollo de los microorganismos edáficos, que a su vez mejoran la nutrición vegetal, por ejemplo a través del suministro de fósforo (micorrizas, bacterias solubilizadoras de P), de otros nutrientes o mineralizando materia orgánica (Subba Rao, 1982). Sin embargo, el papel de los exudados no se reduce a retribuir a los microorganismos con fuentes de carbono sencillas, sino que la planta es capaz de modificar las pautas y composición de sus exudados para favorecer o seleccionar a determinadas bacterias que mejoran el desarrollo del vegetal**.** Esta "inversión" a la que se hace referencia es una estrategia adaptativa de las plantas.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

1.1.2. Composición de los exudados

Los estudios a cerca de la composición de las rizodeposiciones son muy variados y abundantes. Así, se han efectuado sobre plantas herbáceas (Griffin *et al*., 1976; Clarholm, 1985a) y leñosas (Bowen, 1969), en condiciones fisiológicas normales o de estrés (Probanza, 1994; Svenningsson *et al*., 1990). En la Tabla 1.I se recoge la revisión de Curl y Truelove (1986) modificada por nosotros.

Tabla 1.I. Composición de los exudados radicales

Azúcares	Glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa, rhamnosa, ribosa, xilosa, arabinosa, rafinosa, oligosacáridos y polisacáridos
Compuestos aminados	Asparagina, alanina, glicina, cistina/cisteinmetionina, fenilalanina, tirosina, treonina, lisina, prolina, triptofano, ß-alanina, arginina, homoserina, cistationa, L metionina
Ácidos orgánicos	Tartárico, oxálico, cítrico, málico, acético, propiónico, butírico, succínico, fumárico, glicólico, valérico, malónico
Acidos grasos y esteroles	Palmítico, esteárico, oleico, linoleico, colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol.
Factores de crecimiento	Biotina, tiamina, niacina, pantotenato, colina, inositol, ácido p-aminobezoico, ácido n-metil nicotínico, piridoxina
Nucleótidos y flavonas	Flavonas (luteolina, biochanina, sorgolactona (Jones, 1994), adenina, guanina, uridina, citidina
Enzimas	Fosfatasas ácidas (Helal y Dreshr, 1989; Tadano y Sakaii, 1991), amilasas, proteasas
Hormonas	Auxinas, giberelinas (Davies, 1998), citoquininas, ácido abscísico (Müller *et al* , 1989), etileno, ácido cianhidrico
Iones inorgánicos	Cationes 71 % (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, NH_4^{+}, Mg^{2+}), aniones 12 % (SO_4^{2-}, Cl^{-}, PO_4^{3-}, NO_3^{-}) (Smith, 1976), radicales hidroxilo, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (Doke, 1983; Klotz *et al*., 1989; Sutherland, 1991)
Otros compuestos	Sideróforos, sustancias fluorescentes, glicósidos, saponinas, compuestos orgánicos fosforados, compuestos que afectan a nemátodos, estimuladores e inhibidores de crecimiento fúngico, estimuladores e inhibidores de bacterias, de germinación de esporas, de esclerocios, ácidos fenólicos (López de Vitoria y Lovell, 1993).

Fuente: Modificado de Curl y Truelove (1986)

La composición de los exudados varía según la zona de la raíz que se estudie. Los azúcares se liberan a lo largo de toda la raíz, mientras que los aminoácidos y los ácidos orgánicos parecen exudarse sobre todo en las zonas más próximas al ápice (Hoffland, 1992; Jones y Darrah, 1994).

Las moléculas liberadas vía exudación (Tabla 1.I), desempeñan diversas funciones, además de servir como sustratos carbonados (azúcares) y nitrogenados a los microorganismos. Algunas sirven como precursores para la síntesis de otras moléculas que alteran la fisiología de la planta, por ejemplo, el triptófano como precursor de auxinas, otras moléculas funcionan como sustancias quimiotácticas (ácidos fenólicos) o inhibidoras frente a otros microorganismos, o también pueden mejorar la nutrición mineral de la planta, como los ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos son liberados por las raíces para mejorar la nutrición de la planta, ya que facilitan la movilización de metales como el manganeso (Godo y Reisenauer, 1980; Uren, 1982). Los ácidos málico y cítrico forman quelatos estables con Fe^{3+}, mejorando así la nutrición de la planta en este metal (Vaughan *et al.*, 1993; Jones y Kochian, 1996). En condiciones de deficiencia de fósforo se estimula significativamente la exudación de ácidos orgánicos como cítrico, málico, succínico etc., para paliar la deficiencia de la planta en este nutriente (Otani *et al.*, 1996). El mecanismo de acción de estos ácidos consiste en disminuir el pH de la rizosfera, ya que en estas condiciones, las formas de fósforo poco solubles como Ca-P, Al-P, Fe-P se vuelven más solubles, de tal forma que se pueden formar quelatos, o bien, puedan ser absorbidos directamente por las raíces (Gardner *et al.*, 1983; Hoffland, 1992; Zhang *et al.*, 1997). En condiciones de estrés debido a elevadas concentraciones de Al^{3+} se incrementa la liberación de los ácidos orgánicos vía exudación, formándose complejos ácido-ión, de forma que no resultan tóxicos (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995).

La exudación radical no se limita a compuestos orgánicos de bajo peso molecular, sino que incluye también algunas enzimas, como por ejemplo las fosfatasas ácidas (Chhonkar y Tarafdar, 1981), muy importantes para la adquisición de fósforo en suelos ácidos (Haüssling y Marschner, 1989; Tadano y Sakai, 1991). La liberación de fosfatasas es mucho mayor en la zona apical de la raíz que en el resto (Dinkelaker y Marschner, 1992).

Las diferencias existentes en la composición de los exudados hacen que varíe la composición de las poblaciones microbianas rizosféricas (Curl y Truelove, 1986; Bowen y Rovira, 1991). Se ha demostrado la presencia en los exudados de moléculas que sirven de señal para atraer microorganismos simbióticos, patógenos o beneficiosos para la planta, hacia la rizosfera. La mayoría de estos compuestos son ácidos fenólicos con actividad quimiotáctica, activos a bajas concentraciones 10^{-6}-10^{-12} M (López de Vitoria y Lovell, 1993) y dicha actividad quimiotáctica no está relacionada con la capacidad del organismo para metabolizar el sustrato (Reinhold *et al.*, 1985). Estas señales también estimulan la germinación de esporas y la elongación de hifas en micorrizas arbusculares (Tsai y

Philips, 1991) y en ectomicorrizas (Horan y Chilvers, 1990) y provocan cambios en la morfología de las hifas que preceden a la formación de la micorriza (Giovannetti *et al.*, 1993b).

Las plantas son capaces de limitar la colonización de las raíces por parte de bacterias patógenas, produciendo radicales hidroxilo, aniones superóxidos y peróxido de hidrógeno (Doke, 1983; Klotz *et al.*, 1989; Sutherland, 1991). Los fitopatógenos que contienen mayores cantidades de las enzimas capaces de reducir especies de oxígeno activo, como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, son más efectivos como patógenos (Klotz y Hutcheson, 1992).

1.2. Efecto del sistema edáfico sobre la planta

En el suelo conviven una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y algas. Cualquier modificación en la abundancia o en las proporciones relativas de grupos individuales, afecta a la planta a través de las transformaciones de la materia orgánica y de los compuestos minerales que se producen, así como a través de los metabolitos secundarios liberados por dichos microorganismos.

De todos estos grupos el más abundante es el constituido por las bacterias. Su interacción con las raíces es muy importante debido a que utilizan fuentes de carbono y de nitrógeno, compuestos procedentes de la planta vía exudación. De hecho, la concentración de bacterias en torno a las raíces es mucho mayor que en el resto del suelo (Lynch, 1990), y ésto refleja la alta concentración de nutrientes en esta zona que permite un elevado crecimiento y metabolismo bacteriano.

La colonización de las raíces por parte de las bacterias es el primer paso y fundamental, en la interacción planta-microorganismo, y la capacidad de una bacteria de alterar la fisiología de la planta dependerá de su capacidad para establecerse en la rizosfera (Simons *et al.*, 1996). Estudios sobre la colonización microbiana de las raíces indican que las bacterias se distribuyen irregularmente en el rizoplano en función del tipo de planta, del suelo y de las especies de microorganismos (Asanuma *et al.*, 1979). Los factores que afectan a la colonización se describen más adelante.

Los factores edáficos que inciden en el crecimiento de las plantas se pueden agrupar en dos bloques: factores abióticos, que engloban las características fisicoquímicas del suelo, y factores bióticos, que abarcan los microorganismos rizosféricos, simbióticos o de vida libre, beneficiosos, neutros o perjudiciales.

1.2.1. Factores abióticos

En este grupo se encuentran las características fisicoquímicas del suelo, el pH, la concentración de O_2 y CO_2, y la concentración de nutrientes y la estructura del suelo. Sólo hacemos referencia a aquellos factores que afectan especialmente al desarrollo del sistema radical, ya que el efecto de la concentración de nutrientes sobre la parte aérea, producción primaria, es un capítulo

distinto al que se pretende abordar en esta Memoria. Posteriormente, al desarrollar los factores bióticos sí se analiza el efecto de la disponibilidad de nutrientes en éstos.

Las características físicas y químicas de los agregados orgánicos y minerales que constituyen el suelo son factores que influyen en el desarrollo radicular y en su capacidad de exudación, ya que determinan parámetros como la porosidad y, por tanto, la aireación, el potencial hídrico, la transferencia de calor, la disponibilidad de nutrientes y el pH. En general, el efecto rizosfera es más pronunciado en suelos arenosos que en los arcillosos y húmicos, alcanzando los valores más altos en el caso de plantas de dunas de arena y en los desiertos (Curl y Truelove, 1986; Lynch, 1990). Además, la textura del suelo está íntimamente relacionada con la nutrición vegetal, ya que los cationes retenidos por el complejo adsorbente constituyen la fuente principal de nutrientes para la alimentación mineral de las plantas (Duchaufour, 1978).

El nitrógeno incrementa la superficie radical, efecto especialmente acusado cuando la fuente de nitrógeno es amonio (Marschner *et al*., 1986). Al suplementar nutrientes de forma localizada en el sistema radical se ha comprobado que sólo la zona afectada, y no todo el sistema radical, responde al suplemento. En maíz, se ha visto cómo el floema libera productos de la fotosíntesis sólo en la zona donde se suplementa nitrato (Thoms y Sattelmachers, 1990) y también aumenta la respiración radical en esa zona (Granato y Raper, 1989).

El fósforo también afecta al desarrollo radical. Su deficiencia provoca en ciertas plantas la formación de manojos radicales en ciertas raíces laterales denominados “proteoid roots”, que son zonas con una alta tasa respiratoria y, por tanto, con una gran demanda de oxígeno (Vorster y Jooste, 1986). Además, a estas zonas se les atribuye una elevada tasa de exudación, especialmente de ácido cítrico, que parece estar implicado en la mejora nutricional de fósforo en plantas que viven en ambientes deficitarios en este nutriente (Johnson *et al*., 1996).

El pH es un factor muy importante en el desarrollo radical, sobre todo por debajo de 5 y por encima de 7,5. Por encima de este valor, se inhibe el crecimiento radical, hecho que suele estar mediado por la presencia de amoníaco. Se ha comprobado que el amoníaco es capaz de inhibir el crecimiento de la raíz a concentraciones por debajo de 0,05 mM (Schenk y Wehrmann, 1979). Valores de pH inferiores a 5 también inhiben el crecimiento radical; en este caso, parecen estar implicados dos procesos: por una parte, el deterioro que se produce en las bombas de protones (Schubert *et al*., 1990b) y, por otra, las altas concentraciones de aluminio que suelen aparecer en estos suelos, siendo este catión especialmente tóxico para el desarrollo radical (Blamey *et al*., 1991).

Las concentraciones de O_2 y CO_2 varían de un suelo a otro, e incluso dentro del mismo suelo, dependiendo de la temperatura, humedad (Yamaguchi *et al.*, 1967), contenido en materia orgánica (Abrosimova y Revut, 1964), profundidad del suelo (Wood *et al.*, 1993) y tipo de cultivo (Buyanovsky y Wagner, 1983). La influencia de las rizobacterias sobre la planta depende, en gran medida, de que

éstas encuentren óptimos de crecimiento en el medio donde se desarrollan. De este modo, variaciones en la concentración de estos gases afectarán al crecimiento de las poblaciones microbianas y a su capacidad de biocontrol (Kim *et al.*, 1996), por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* sintetiza menos sideróforos cuando las concentraciones de CO_2 son altas (Kim y Misaghi, 1992).

1.2.2. Factores bióticos

El factor biótico está constituido por los microorganismos edáficos, principalmente hongos y bacterias; éstas últimas, más abundantes, pueden ser simbióticas o de vida libre. Aún siendo de vida libre, los microorganismos que se desarrollan en el sistema rizosférico están íntimamente relacionados con el sistema radical, dada la dependencia energética que se establece, debido a que estos microorganismos se desarrollan cubriendo parcialmente la superficie radical o muy próximos a ella. Por tanto, los metabolitos microbianos interfieren con el metabolismo de la planta y pueden causar respuestas fisiológicas inmediatas y de magnitud considerable.

La interacción entre bacterias y raíces puede ser beneficiosa, perjudicial o neutra para la planta y, en ocasiones, el efecto de una bacteria determinada varía según las condiciones del suelo (Lynch, 1990). Parece existir una alta especificidad entre el genotipo de la planta y el de la bacteria, con respecto a la capacidad de la bacteria para estimular el crecimiento de la planta (Provorov *et al.*, 1994; García de Salomone y Döbereiner, 1996). Sin embargo, cada vez más estudios demuestran que el efecto estimulador del crecimiento ejercido por una bacteria no se limita estrictamente al de la planta de origen solamente, aunque ésto no se puede generalizar (Eneback *et al*., 1998), lo que hace necesario los ensayos de inoculaciones cruzadas para comprobar el efecto de la bacteria.

Dada la trascendencia del factor biótico y los variados efectos que pueden ejercer, hemos separado hongos de bacterias, agrupando estas últimas según tengan un efecto negativo (DRBs) o positivo (simbióticas o de vida libre, PGPRs).

En cuanto a los hongos edáficos que afectan al crecimiento vegetal citaremos las micorrizas, que son simbiosis entre hongos y raíces de plantas superiores. La planta suministra al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis, además de un nicho ecológico protegido de los fenómenos de antagonismo microbiano en la rizosfera. Por su parte, el hongo facilita a la planta la absorción de los nutrientes minerales del suelo, principalmente fósforo (Bolan *et al*., 1987), por lo que, en suelos con un bajo contenido en fósforo asimilable, caso generalizado de la mayoría de suelos agrícolas y forestales, las micorrizas influyen en la economía nutritiva de la planta (Tinker *et al*., 1992). Además, pueden inducir ciertos mecanismos para lograr una mayor capacidad de absorción del fósforo en la planta a través de cambios morfológicos (aumento de la superficie radical), o cambios fisiológicos.

La mayoría de las plantas se encuentran micorrizadas y el término micorrizosfera (Rambelli, 1973) se ha utilizado para describir la porción de suelo bajo la influencia de las raíces micorrizadas, las

cuales alteran significativamente la composición física, química y microbiológica de la rizosfera (Katznelson *et al.*, 1962; Oswald y Ferchau, 1968; Rambelli, 1973; Linderman, 1988), benefician a la planta aumentando su resistencia contra patógenos, mejoran su nutrición (sobre todo la captación de fósforo) y la protegen de diversas toxinas (Harley y Smith, 1983). La aparición o no de micorrizas influye en la exudación de fosfatasas ácidas por parte de la planta; estas enzimas son de vital importancia para la planta en ciertas circunstancias, y son más abundantes en raíces no micorrizadas que en raíces micorrizadas.

Se sabe que las auxinas y el etileno, principalmente, y la acción combinada de éstas con citoquininas y giberelinas controlan la formación y desarrollo de las raíces, lo cual hace suponer que estas hormonas intervienen en la formación de las micorrizas. En las micorrizas formadoras de manto (ectomicorrizas) se ha demostrado que los hongos que las originan producen auxinas, y que éstas son rápidamente absorbidas por las raíces de las plantas huéspedes, originándose cambios morfológicos que facilitan el establecimiento de la simbiosis (Rudawska *et al*., 1997). También, se ha puesto de manifiesto que estos hongos producen citoquininas y giberelinas sin que se sepa exactamente la función de éstas en el proceso de infección (Strzelczyk *et al*., 1984).

Varios trabajos experimentales han apuntado la existencia de interacciones entre las micorrizas y otros microorganismos rizosféricos (Nurmiaho-Lassila *et al*., 1997; Olsson *et al*., 1996). Hay que tener en cuenta que los exudados radicales de las plantas micorrizadas difieren de las no micorrizadas, no sólo porque cambia el estado nutricional de la planta huésped, sino también debido a la gran cantidad de tejido del hongo presente en la raíz micorrizada, que puede afectar más directamente a los exudados (Marschner *et al*., 1997). En el caso de las micorrizas formadoras de manto, se sabe que éstas inducen cambios cualitativos y cuantitativos en la microflora del suelo (Andrade *et al*., 1997; Andrade *et al*., 1998).

En cuanto a las bacterias de vida libre que ejercen un efecto negativo sobre la planta, conocidas como bacterias deletéreas (DRBs), coexisten con otras rizobacterias que pueden ser neutras o beneficiosas para la planta (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996). Reducen el crecimiento de la planta, bien causando daños en los tejidos radicales, o bien produciendo metabolitos tóxicos que inhiben el crecimiento y desarrollo del sistema radical (Brian *et al.*, 1951; Sarathchandra *et al.*,. 1996); no obstante, pueden actuar sin ocasionar síntomas visibles, de forma que sea difícil detectar su presencia (Fredrickson y Elliot, 1985a; Bakker y Schippers, 1987; Schippers *et al*., 1987). En condiciones de laboratorio, no existen factores ambientales que pudieran favorecer la producción de fitotoxinas, lo que dificulta su diagnóstico. Este tipo de bacterias perjudiciales, denominadas DRBs (Deleterious Rhizobacteria), pertenecen en su mayoría al género *Pseudomonas* (Elliott y Lynch, 1984) y han sido aisladas de ecosistemas muy diversos (Woltz, 1978; Suslow y Schroth, 1982); de hecho, Brown.,(1974*)* observan que el 40 % de la bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* de la

rizosfera de trébol son inhibidoras del crecimiento radical. No obstante, se han descrito DRBs de muchos géneros bacterianos como *Desulfovibrio, Erwinia, Agrobacterium, Enterobacter* (Lynch, 1990).

Suslow *et al*. (1982) definieron como patógenos menores de las raíces de las plantas a aquellas que ocupaban la rizosfera, el rizoplano y el córtex radical, pero que no penetran en el tejido vascular. Inicialmente, las DRBs no se consideraban colonizadoras de la endorrizosfera y estaban descritas como patógenos no parásitos (Woltz, 1978;, Schroth y Hancock, 1982). Ahora se sabe que las rizobacterias, incluidas las DRBs, penetran frecuentemente en el córtex radical intercelularmente.

Las DRBs también pueden reducir los índices de germinación (Probanza *et al*., 1996); provocar lesiones en las raíces, destruyendo sus células corticales; ocasionar coloración y decoloración; síntomas de necrosis o distorsión, e inhibición del desarrollo de pelos radicales (Suslow y Schroth, 1982; Schippers *et al*., 1987); aumentar la sensibilidad de la planta al ataque de patógenos (Elliott y Lynch, 1985); inhibir el crecimiento de raíces mediante la producción de metabolitos tóxicos extracelulares (Woltz, 1978; Fredrickson y Elliot, 1985), inhibir el crecimiento primario a través de fitotoxinas; inhibir la capacidad de las plantas a ser micorrizadas, competir por nutrientes, por ejemplo es posible que algunas DRBs pudieran contrarrestrar el efecto de rizobacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum*. Otro mecanismo por el que las DRBs afectan al crecimiento vegetal es la producción de fitohormonas (Schippers *et al*., 1987).

La producción de ácido cianhídrico puede ser una de las causas que modifican el patrón del crecimiento radical. Este compuesto se ha detectado en los medios de cultivo de numerosas cepas, entre otras, del género *Pseudomonas* (Bakker y Schippers, 1987; Schippers *et al*., 1991; Gutiérrez Mañero *et al*., 1996) y su acción negativa sobre el metabolismo vegetal se debe a su capacidad de bloquear el funcionamiento de enzimas implicadas en la respiración celular y, por lo tanto, en la obtención de energía.

El efecto de estas bacterias en condiciones de campo no suele detectarse, ya que no provocan síntomas identificables en las plantas, aunque reducen considerablemente la producción vegetal (Sarathchandra *et al*., 1996). Los síntomas foliares, cuando se presentan, son frecuentemente confundidos con los producidos por deficiencia de nutrientes (Woltz, 1978).

Generalmente, las DRBs no causan la muerte de las plantas. Alström (1987) reporta síntomas de marchitez en plantas de frijol inoculadas en una concentración de 6×10^{10} ufc mL^{-1} de la cepa de *Pseudomonas* S596; sin embargo, cuando se inoculaba en concentraciones menores, esta cepa provocaba enanismo pero no marchitez (Schippers *et al*., 1987).

Actualmente se considera que las DRBs están frecuentemente asociadas a una disminución de la producción de ciertos cultivos como trigo, maíz, cebada, patata (Woltz, 1978; Schippers *et al*., 1985; Geels *et al*., 1896; Schippers *et al*., 1987)

Los microorganismos que establecen simbiosis lo hacen con determinadas especies de plantas, tal es el caso de la fijación simbiótica del nitrógeno (FSN), la cual es importante en la producción primaria, ya que supone la entrada de nitrógeno más importante en los ecosistemas terrestres (Tamm, 1991).

Las relaciones simbióticas más estudiadas corresponden a *Rhizobium-Bradhyrhizobium-Azorhizobium-Sinorhizobium* con leguminosas, y a *Frankia* con angiospermas no leguminosas. Algunas cianofíceas también establecen simbiosis, si bien lo hacen con pteridofitos del género *Azolla*, pudiendo fijar entre 70-110 Kg. de nitrógeno por hectárea y año (Ventura y Wantanbe, 1993). Asimismo, las cianobacterias del género *Nostoc* establecen simbiosis con una herbácea tropical del género *Gunnera* (Rasmussen *et al.*, 1996). Otra simbiosis, la que se establece entre rizobios y las plantas del género *Parasponia* (Familia Ulmaceae), es la única conocida entre un rizobio y una planta no leguminosa.

El desarrollo de la simbiosis requiere de señales moleculares entre los rizobios y las células de la planta. Los polisacáridos superficiales característicos de rizobios, particularmente exopolisacáridos y lipopolisacáridos, parecen estar implicados en la simbiosis con distintas leguminosas (Gray y Rolfe, 1990; Leigh y Coplin, 1992).

Por último, las bacterias edáficas de vida libre con un efecto beneficioso sobre la planta se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o por su acrónimo PGPRs. Estas bacterias ejercen su efecto por dos vías, directa o indirecta, y cada una de ellas se puede desarrollar de diferentes formas, pudiendo una misma cepa utilizar más de un mecanismo de acción. Además, como ya se comentó anteriormente, para que las PGPRs ejerzan su efecto es requisito indispensable que exista un cierto grado de colonización radical. Dada la relevancia de todos estos puntos se describen a continuación en otro apartado.

1.3. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPRs)

Las bacterias edáficas beneficiosas de vida libre se denominan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria,* (literalmente, rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) o por su acrónimo PGPRs (Kloepper *et al.*, 1989), también denominadas por otros autores bacterias que aumentan el rendimiento, o por su acrónimo, YIB (Yield Increasing Bacteria) (Piao *et al* ., 1992; Tang, 1994). Sin embargo, Bashan y Holguin, (1998) proponen que el término PGPR debería actualizarse, ya que muchas de las bacterias que ejercen efectos beneficiosos en las plantas pueden desarrollarse fuera del sistema rizosférico, y por lo tanto este término es restrictivo. El término PGPR se acuñó cuando este campo de investigación estaba aún poco desarrollado, y actualmente es un término ampliamente discutido (Bashan *et al* ., 1993; Tuzun y Kloepper, 1994). Dada la enorme expansión en el estudio de estas bacterias, actualmente se propone la separación en 2 grupos, las PGPB (Plant

Growth-promoting Bacteria, Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas), que afectan estrictamente al crecimiento vegetal, y las "biocontrol-PGPB", cuando se refiere a bacterias que controlan fitopatógenos, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta. No obstante, en el presente trabajo se mantiene el término **PGPRs** en un sentido general, tanto para designar a aquellas que incrementan el crecimiento y productividad de la planta como para aquellas que controlan a algunos fitopatógenos , presentes en la rizosfera o fuera de ella.

Dentro de las PGPRs encontramos bacterias pertenecientes a un gran número de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Brown, 1974; Elmerich, 1984; Kloepper *et al.*, 1988; Kloepper *et al.*, 1989; Bashan y Levanony, 1990; Tang, 1994; Okon y Labandera-González, 1994; Probanza *et al.*, 1996).

1.3.1.Mecanismos de acción

Se pueden definir dos posibles mecanismos de estimulación del crecimiento de las PGPRs, indirectos o directos, y a su vez cada uno de ellos puede ocurrir de distintas formas.

1.3.1.1. Mecanismos indirectos

Cuando la estimulación del crecimiento es indirecta, la bacteria libera algún metabolito, que a su vez, afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta (Kloepper, 1993). Se pueden resumir en los grupos que se describen a continuación.

* Producción de sustancias movilizadoras de nutrientes, como ácidos orgánicos (Yosikawa *et al*, 1993; Jones, 1998) o aminoácidos (Jones *et al*, 1994), liberados por las bacterias al medio, que son capaces de movilizar fósforo, hierro y/o aluminio.

* Producción de sideróforos. La producción de estos metabolitos permite a las PGPRs competir satisfactoriamente contra patógenos y otras bacterias saprofíticas (Kloepper *et al.*, 1980; Leong, 1986; Weller, 1988). Los sideróforos secretados por las PGPRs quelan la mayor parte del Fe^{3+} presente en el suelo, disminuyendo su disponibilidad para otros microorganismos, entre los que se encuentran los patógenos, y evitando así que proliferen debido a la carencia de este nutriente (O´Sullivan y O´Gara, 1992). La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de patógenos depende de la planta, del fitopatógeno a eliminar, la composición del suelo, la bacteria PGPR y la afinidad del sideróforo por el hierro (Glick, 1995).

Las plantas no sólo no se ven afectadas por el secuestro de hierro por parte de las bacterias, ya que la mayoría de las plantas son capaces de crecer en medios con concentraciones de Fe^{3+} mucho más bajas que los microorganismos (incluso 1000 veces menores) (O´Sullivan y O´Gara, 1992), sino que

además, algunas son capaces de capturar el complejo sideróforo-hierro (Crowley *et al.*, 1988; Bar-Ness *et al.*, 1991, 1992; Wang *et al* ., 1993), mejorando así su nutrición.

* Control de patógenos mediante antagonismos o competencia. (Burr y Caesar, 1984; Schroth *et al.*, 1984; Gaskins *et al.*, 1985; Davison, 1988). Muchas bacterias, y en particular las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas antifúngicas como la pirrolnitrina, pioluteorina, tropolona, etc. (Howell y Stipanovic, 1979; Howell y Stipanovic, 1980; Lindbergh, 1981). Asimismo, existen cepas bacterianas capaces de sintetizar sustancias contra otras bacterias: los antibióticos. (Schnider *et al.*, 1994). Éste es probablemente el mecanismo alelopático por excelencia para reducir competencias.

* Resistencia Sistémica Adquirida e Inducida. Las rizobacterias no patógenas pueden inducir una resistencia sistémica en las plantas similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR) cuando son atacadas por patógenos. La mediación de diferentes cepas bacterianas en la Resistencia Sistémica Inducida (SIR) ha sido demostrada contra hongos, bacterias y virus en diversos cultivos como cucurbitáceas, frijoles, tabaco, tomate, etc.. (van Loon *et al.*, 1998).

Determinadas bacterias inducen la resistencia sistémica, produciendo diferentes compuestos tales como lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico; sin embargo, esta inducción depende de que las bacterias colonicen el sistema radical en número suficiente (van Loon *et al.*, 1998). Por ejemplo, algunas bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de inducir resistencia por parte de la planta, incrementando la velocidad y los niveles de síntesis de compuestos, llamados fitoalexinas, implicados en la defensa de la planta (Lemanceau y Alabouvette, 1993). La señal responsable de la inducción de resistencia y del aumento en la acumulación de fitoalexinas está inducida por los lipopolisacáridos de la bacteria (Lemanceau y Alabouvette, 1993). Dentro de este apartado se puede incluir la inducción de barreras físicas, como las inducidas por ciertas cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* al provocar modificaciones en las paredes celulares de las células epidérmicas y del córtex (Benhamou *et al.*, 1996).

* Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos. Toyoda y Utsumi (1991) describen cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas solanacearum* capaces de hidrolizar el ácido fusárico, agente causante del marchitamiento por infección de *Fusarium.*

* Síntesis de enzimas hidrolíticas de pared fúngica. Lim *et al.*, (1991) describen como *Pseudomonas cepacia* libera β 1,3-glucanasa, inhibiendo el desarrollo de *Phytium ultimum* y *Rhizoctonia solani* .

* Competencia por nutrientes y nichos ecológicos (Kloepper *et al.*, 1988; O´Sullivan y O´Gara, 1992; Devliegher *et al.*, 1995).

* Síntesis de ácido cianhídrico. Las bacterias del género *Pseudomonas* lo producen habitualmente, lo que apunta hacia un posible efecto antipatogénico, si bien no está firmemente establecido el mecanismo (Voisard *et al*., 1989).

* Control de plagas producidas por insectos. Zehnder *et al*., (1997a), trabajando con plantas de pepino, demuestran que algunas de las PGPRs ensayadas, alteran el comportamiento de los escarabajos, *Acalymma vittatum* y *Diabrotica undecimpunctata howardi* que provocan importantes pérdidas en las cosechas. Uno de estos mecanismos ha sido demostrado en pepino, donde se ha visto que las plantas tratadas con PGPRs muestran una reducción significativa en los niveles de cucurbitacina, sustancia que sirve de señal alimenticia para las larvas de estos escarabajos, que la ingieren, reduciéndose así drásticamente las poblaciones del insecto en las plantas tratadas con PGPRs (Zehnder *et al*., 1997b). Por otra parte, estos escarabajos son vectores de *Erwinia tracheiphila*, que causa enfermedades en las plantas de pepino; ésta queda controlada también en las plantas tratadas con PGPRs como consecuencia de la reducción en las poblaciones del escarabajo (Zehnder *et al*., 1997 a y b).

Dentro de este apartado vale la pena mencionar el uso de *B.turinghensis* dentro de programas de Manejo Integrado de Plagas. La aplicación foliar de esta bacteria es muy selectiva para un grupo específico de plagas, y además, presenta una baja toxicidad para los mamíferos (Jackson, 1996). Se usa en el control de plagas de insectos que atacan a la parte aérea de las plantas, principalmente dirigido a lepidópteros que se alimentan de las hojas, tales como *Helicoperva* spp y *Plutella xylostella*. Estos insectos son sensibles a la endotoxina producida por *B.turinghensis* var. *Kurstaki*, y mueren al ingerir las hojas bañadas con la bacteria.

1.3.1.2.M**ecanismos directos**

Son aquellos en los que el metabolito producido por la bacteria es en sí capaz de estimular el crecimiento vegetal, y por tanto, ocurre independiente del resto de la población microbiana edáfica (Kloepper, 1993), e incluso independientemente del soporte edáfico, es decir, no ejerce su efecto por modificación del sustrato. De forma resumida los mecanismos de acción directa se muestran en la Tabla 1.II.

Tabla 1.II Mecanismos de acción directa de las PGPRs (Modificado de Chanway, 1997)

Mecanismo	***Efecto***	***Referencia(s)***
Fijación de nitrógeno asociada a la raíz	Biomasa y contenido en nitrógeno	Dobereiner y De-Poli, 1980
Producción de hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas)	Biomasa (parte aérea y radical) ; ramificación de raíces; floración	Holl *et al*., 1988; Gutierrez Mañero *et al*., 1996.
Inhibición de síntesis de etileno	Longitud radical	Glick *et al*., 1994
Aumento de la permeabilidad de raíz	Biomasa y captación de nutrientes	Sumner, 1990

Cada bacteria en particular puede afectar al crecimiento de la planta, utilizando uno o varios de estos mecanismos. Sin embargo, es difícil delimitar el mecanismo de acción utilizado debido, por una parte, a que pueden utilizar varios (Holl *et al.*, 1988), y por otra, a que son necesarios estudios del estado nutricional de las plantas y del suelo en presencia y ausencia de nutrientes, análisis de la morfología aérea y radical, así como ensayos del efecto de la inoculación en condiciones estériles y no estériles. Además, la dificultad asociada a los límites de detección *in situ* de las bajas concentraciones de hormona producidas por las bacterias, como *Azospirillum* por ejemplo, hacen difícil la confirmación de que la producción bacteriana de hormonas esté directamente relacionada con la estimulación del crecimiento vegetal (Sumner, 1990). En este sentido, los estudios dirigidos a dilucidar el mecanismo de acción concreto de promoción del crecimiento deberían enfocarse con mutaciones específicas de la característica metabólica bacteriana implicada (Chanway, 1997).

El mecanismo de acción directo de las PGPRs por excelencia es la producción de fitohormonas (Brown, 1974; Tien *et al.*, 1979). Algunas especies de los géneros *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizosfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento especialmente marcado cuando éstas están en estado de plántula (Brown, 1974; Nieto y Frankenberger, 1989; Lebuhn *et al.*, 1994). Probablemente la capacidad de *Azospirillum* para estimular el crecimiento de leguminosas se debe a su capacidad para producir hormonas, aumentando la capacidad de la planta para asimilar agua y nutrientes y favoreciendo la infección por *Rhizobium*, es decir, incrementando la cantidad de nódulos por planta (Okon y Itzigsohn, 1995). Probanza *et al.* (1996) demuestran que entre las rizobacterias de aliso hay algunas del género *Bacillus* que estimulan claramente la germinación y el crecimiento vegetal, y esto es debido en parte a la producción de auxinas (Gutiérrez Mañero *et al*., 1996).

La producción bacteriana de giberelinas es menos común que la de auxinas. Aparece descrita en la literatura científica por prueba biológica, que es la reversión de la enanización, comprobándose que cepas de *Azospirillum brasilensis* y alguna del género *Rhizobium*, son capaces de sintetizar sustancias con actividad giberelina (Tien *et al*., 1979; Williams y Sicardi de Mallorca, 1982). Los únicos trabajos publicados que confirman por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) la síntesis bacteriana de giberelinas son los de Atzorn *et al*. (1988), que demuestran la producción por *Rhizobium phaseoli* en nódulos; los de Bottini *et al*. (1989), que demuestran la

producción por *Azospirillum lipoferum* en medio de cultivo; y los de Bastián *et al*. (1998), que demuestran la producción por *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillus seropedicaea*, también en medio de cultivo. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de giberelinas producidas por estos microorganismos se confirma por GC-MS, cuantificando la producción de este tipo de hormonas alrededor de ng L^{-1} en todos los casos. Rademacher (1994) señala que las PGPRs capaces de sintetizar este tipo de hormonas, sintetizan giberelinas C19, que son las formas activas. Dada la relevancia de este tipo de hormonas en esta Memoria, se tratarán de forma más amplia en capítulo aparte.

Otra hormona implicada en la acción de las PGPRs es el etileno. Parece que aquellas cepas capaces de crecer con ACC como única fuente de nitrógeno es porque tienen la enzima ACC desaminasa (Glick *et al.*, 1995) y suelen ser promotoras del crecimiento. Se ha demostrado, que *Pseudomonas putida* es capaz de sintetizar la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa) (Jacobson, 1993; Jacobson *et al.*, 1994). Esta enzima hidroliza el ACC, precursor inmediato de la biosíntesis del etileno en plantas, lo hidroliza a nivel rizosférico, provocando una disminución en la concentración de ACC en la planta, que se traduce en una elongación radical. Además, el etileno estimula la germinación, rompe la dormición de las semillas (Esashi, 1991) y actúa sinérgicamente con otros microorganismos como las bacterias fijadoras simbióticas (DeFreitas *et al.*, 1993).

1.3.2. Giberelinas

Este tipo de hormonas se descubrió en Japón, en cultivos enfermos de arroz, en los que las plantas presentaban un crecimiento en longitud extraordinario, pero perdían la capacidad de producción de semillas, enfermedad conocida como "*bakanae*". El análisis de las plantas enfermas indicó que estaban infectadas por un hongo, *Gibberella fujikuroi*, responsable de la elongación desmesurada de los tallos; el compuesto aislado a partir de cultivos del hongo se denominó giberelina, y dio nombre a esta familia de hormonas.

A partir de 1930 en Japón, se aislaron cristales impuros de compuestos activos producidos por el hongo, denominados giberelina A y B. Por otra parte, y a partir de 1950, científicos británicos y estadounidenses determinaron la estructura de un compuesto que aislaron de filtrados del cultivo del hongo, y que denominaron ácido giberélico. Desde ese momento, se confirmó la existencia de esta nueva familia de hormonas, que derivan del anillo del ent-kaureno. Desde que se identificaron como metabolitos producidos por el hongo, las giberelinas se han aislado en plantas, identificándose los compuestos de tipo giberelina en primer lugar, mediante ensayo biológico, es decir, demostrando su actividad biológica frente a plantas, pero a falta de definir su estructura química. La respuesta biológica indica, pero no confirma, la presencia de estas moléculas.

En 1958, Jake MacMillan identificó la GA_1 en plantas superiores, y desde entonces, se han caracterizado más de 100, tanto de origen vegetal como fúngico. Por convenio, y dado el elevado número, se han ido nombrando como GA_n, por orden de descubrimiento. A pesar de la cantidad de giberelinas presentes en las plantas, la mayoría no son activas y se acumulan como precursores o formas inactivas.

Existen varias pruebas biológicas para la detección de giberelinas (Reeve y Crozier, 1975), y todas se basan en aquellos procesos mediados por giberelinas endógenas. Los más comunes son la elongación de hipocotilo de lechuga, reversión de la enanización en plantas enanas y movilización de α-amilasas en endospermo de centeno. Las dos primeras se basan en respuestas de crecimiento, y la última, en la producción de enzimas inducidas por las giberelinas.

Los estudios de identificación y cuantificación de giberelinas se realizan actualmente por cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas, previo fraccionamiento en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados de esta técnica son indiscutibles, puesto que el espectro de masas es característico de cada molécula, y la intensidad de la señal puede utilizarse en la cuantificación. No obstante, hasta el desarrollo de estas técnicas, los ensayos biológicos se han utilizado como prueba presuntiva de la presencia de giberelinas, ya que medidas físicas o químicas de este tipo de compuestos eran prácticamente imposibles, al no absorber luz ultravioleta, no ser fluorescentes y carecer de características químicas que faciliten una reacción específica.

Sólo algunas GAs poseen actividad biológica intrínseca, aquellas que poseen 19 carbonos, denominadas C19; las demás poseen 20 C, y la mayoría de ellas son precursores o productos de las mismas. Cuando se aplican exógenamente las C19, entre las que se encuentran la GA_1, GA_3, GA_4 y GA_7, son las más activas, y todas presentan un grupo hidroxilo en la posición 3β. Se ha demostrado que la GA_1 es la más activa *per se*, y actúa en el proceso de elongación caulinar en la mayoría de las especies (Davies., 1998). Sin embargo, existen otras giberelinas también activas, que pueden ser características de cada planta o tejido. Por ejemplo, la GA_3, cuya distribución en plantas superiores no es muy amplia, es capaz de producir el mismo efecto que la GA_1 en pruebas biológicas. También se ha demostrado que la GA_4, presente en la familia Cucurbitaceae, es tan activa o más que la GA_1, al menos en determinadas especies (Kobayashi *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1997). Las otras giberelinas se inactivan por varios procesos, que se pueden resumir en hidroxilaciones en ciertos carbonos o glicosilaciones.

La aplicación exógena de giberelinas tiene una amplia variedad de respuestas en las plantas, y siempre actúan en concentraciones muy bajas (ng L^{-1}). El más llamativo es la inducción de la elongación del tallo y floración en variedades genéticamente enanas (Phinney, 1956), y en las plantas de día largo (Lang, 1956), evitando también la necesidad de bajas temperaturas requeridas en este proceso. El mecanismo por el cual estimulan el crecimiento del tallo es

aumentar la elongación y la división celular. El efecto de las GAs sobre la síntesis enzimática se ha estudiado principalmente en la capa de aleurona de las semillas de los cereales, que en respuesta a la aplicación de GAs libera numerosas hidrolasas, principalmente α-amilasas (Chrispeels y Varner, 1967). La aplicación de GAs modifica sustancialmente los procesos reproductivos de los vegetales (Pharis y King, 1985). En general, la aplicación de GAs inhibe la floración en las angiospermas leñosas y en los frutales, así como el cuajado y desarrollo del fruto. Las giberelinas pueden causar reversión de la fase de adulto a la fase juvenil. En algunas especies de coníferas, sin embargo, este tratamiento induce floración precoz. También se observa una tendencia a producir flores masculinas en aquellas plantas que poseen flores con sexos separados, y retraso de la senescencia, demorando la pérdida de clorofilas en hojas, y de pigmentos en frutos (Nooden y Leopold, 1978; Saks y Vanstaden, 1992; Takahashi *et al.*, 1991). Por último, pueden sustituir los requerimientos de luz o frío que precisan muchas semillas para germinar (Hartmann *et al.*, 1990). La influencia sobre la formación de raíces puede ser negativa, inhibiendo el proceso (Arteca, 1996), o positiva (Batten y Goodwin, 1978; Hartmann *et al*., 1990; Hansen, 1987), aunque este efecto no está respaldado por un soporte experimental tan amplio como la inhibición. Estos efectos dependen de la especie estudiada, y en la mayoría de los casos, del balance hormonal de la planta.

Así, basándonos en los efectos de la aplicación exógena de giberelinas descritos anteriormente, este tipo de hormonas tiene importantes aplicaciones industriales. La aceleración del proceso de malteado de la cebada, ya que al liberarse mayor cantidad de α-amilasas, este proceso se optimiza y acelera. La aplicación sobre las uvas apirenas tiene dos efectos, que repercuten en una mejora de la producción, por una parte, se alargan los pedúnculos sobre los que crece la uva, evitando que se retenga humedad y, por lo tanto, evitando la podredumbre del fruto, y por otra parte, alargando los frutos, que presentan mejor aspecto. También se aplica sobre otros frutos para conseguir aumentar el tamaño, lo que se traduce en un mejor aspecto (Westwood y Bjornstad, 1968). La aplicación sobre cítricos retrasa la senescencia foliar, alargando el período de cosecha. También aumenta en el rendimiento de caña de azúcar, al aumentar el tamaño de la distancia internodal donde ésta se acumula. Además, se pueden obtener beneficios en otros cultivos donde sea recomendable una reducción en altura, aplicando inhibidores de la síntesis de giberelinas (Arteca, 1996), por ejemplo, en la producción de planta ornamental, o en cultivos de cereal en climas lluviosos y fríos, para evitar que las espigas se doblen, y en el control de malas hierbas.

Hasta la fecha, la producción de giberelinas se ha realizado de dos formas, por fermentación, en cultivos del hongo *Gibberella fujikuroi* o por síntesis química. En primer lugar, la GA_3 se produce por fermentación, a partir de cultivos del hongo *Gibberella fujikuroi*. Las cepas fúngicas se han ido

seleccionando de la naturaleza, aprovechando las que tienen mayor productividad de giberelinas. A partir de cultivos puros, tras períodos largos, que pueden fluctuar entre 15 y 18 días, y con estrecha dependencia de los nutrientes disponibles, la temperatura y el tipo de fermentación (Borrow *et al*, 1955), se consiguen rendimientos que oscilan entre los 0.04 g L^{-1} y los 0.2 g L^{-1}. En estos cultivos se obtiene como producto principal GA_3, junto con una mezcla de GA_4 y GA_7, que resulta difícil de separar y purificar. El largo proceso de fermentación va seguido de extracciones y purificaciones que incrementan el coste del proceso industrial. Estudios recientes (Graebbe y Rademacher, 1994) han demostrado la capacidad de otro hongo *Sphaceloma manihoticola* (DSM 1638) de sintetizar giberelinas. Esta cepa produce GA_4 en cantidades notables (hasta 7 mg L^{-1}), junto con una mezcla de otras giberelinas en cantidades menos importantes, por fermentación y en un período de tiempo largo (25 días).

En vista de lo anterior, no todas las giberelinas que existen pueden producirse por fermentación. El resto de las giberelinas se producen por síntesis química, ya que la obtención a partir de material vegetal es engorrosa, larga y lleva mucho tiempo. Ambos procesos tienen un elevado coste, si bien la producción de GA_3 a partir de *G. fujikuroi* tiene un coste menor que la síntesis química.

1.3.3.Colonización

Como ya se ha comentado anteriormente la colonización radical se considera requisito indispensable para que la bacteria inoculada ejerza su efecto (Simmons *et al.*, 1996).

Dado que el fundamento de las competencias en la rizosfera es el gran desconocido (Jjemba y Alexander, 1998), el éxito de la inoculación de PGPRs en la rizosfera de diversas plantas, en ocasiones resulta errática (Germida y Walley, 1996) sin que se conozcan los factores que conducen al fracaso.

La actividad y la supervivencia de las PGPRs en la rizosfera depende de diversos factores. Entre éstos encontramos factores físicos o químicos, tales como pH, textura, disponibilidad de nutrientes, humedad y temperatura, contenido en materia orgánica, y, sobre todo, de las interacciones con otros microorganismos en la rizosfera. La interacción con el factor biótico es importante, ya que además de la ocupación de nicho que debe tener lugar (Nehl *et al.*, 1997), adhiriéndose físicamente a la raíz, la población inoculada debe competir activamente por los nutrientes disponibles, sustratos liberados vía exudación principalmente (Jjemba y Alexander, 1998), manteniendo una población umbral mínima, necesaria para desencadenar el efecto biológico en la planta (Hatzinger y Alexander, 1994). Así mismo, la resistencia a la predación por protozoos es un factor importante en la supervivencia de ciertas poblaciones bacterianas (Zwart *et al.*, 1994).

Independientemente de los factores que condicionan una buena colonización, es necesario monitorizar el inóculo introducido, con el fin de evaluar su impacto en el entorno rizosférico. La introducción de una bacteria potencialmente PGPR puede alterar la comunidad rizobacteriana

autóctona, que afecta de forma indirecta a la salud de la planta (Gilbert *et al.*, 1993). La población introducida puede establecerse sin causar alteraciones, puede establecerse alterando la comunidad autóctona, y puede no establecerse y, sin embargo, causar una alteración duradera de esta comunidad (Gilbert *et al.*, 1993). Es necesario saber cómo va a evolucionar el inóculo con el fin de calibrar los riesgos y beneficios de la introducción de microorganismos, ya sean naturales o genéticamente modificados (Tiedje *et al.*, 1989).

Entre las técnicas utilizadas en la monitorización de los inóculos se encuentran aquellas basadas en los métodos tradicionales, crecimiento en placa en medios generales (Hattori y Hattori, 1976; De Leij *et al.*, 1995) y selectivos (Van Elsas y Waalwijk, 1991, Smit *et al.*, 1995), perfiles metabólicos BIOLOG (Winding 1994; Insam y Rangger, 1997), evaluación de la biomasa bacteriana (Naseby y Lynch, 1997), enzimas del suelo (Doyle y Stotzky, 1993). Existen otros métodos que se basan en la estructura de la comunidad microbiana, como el perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos, PLFAs (Frostergard *et al.*, 1997) y sobre todo las técnicas moleculares. En este sentido podemos decir que existen técnicas moleculares (van Elsas *et al.*, 1998) con un poder de resolución mayor para la identificación a nivel de cepa bacteriana, diferenciando cepas dentro de la misma especie, como son los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis en campo pulsado (PFGE), análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (AFLP), cebado arbitrario-PCR (AP-PCR), amplificación al azar de polimorfismos de ADN (RAPD), amplificación de secuencias repetitivas y altamente conservadas (rep-PCR, eric-PCR y box-PCR), secuenciación de ADN, etc... (Swings, 1995; Rademaker y Bruijn, 1997).

Cada uno de los métodos mencionados tiene sus ventajas e inconvenientes, en función de los objetivos. Cuanto más selectivo es, menor es su capacidad para detectar alteraciones globales. Por el contrario, aquellos métodos de menor selectividad informarán de cambios globales cenóticos pues se detecta la presencia concreta de la cepa inoculada. No obstante, lo determinante en el empleo de una u otra técnica es que sea capaz de resolver la relación entre la colonización y el efecto biológico

Por último, lo más importante es que la colonización tenga un efecto biológico patente en la producción primaria de la planta.

1.4. *Alnus glutinosa*

El aliso, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., se encuentra encuadrado taxonómicamente en el orden fagales, dentro de la familia Betulaceae. Se trata de un árbol de tamaño medio, que no suele exceder los 20 m de altura, aunque se conocen ejemplares de 30 m, y que se desprende de sus hojas para pasar el invierno.

El tronco es derecho, de casi 1 m de diámetro, con corteza pardo-oscura resquebrajada, casi lisa y de color pardo-grisácea o pardo-rojiza en ejemplares jóvenes. La copa es, al principio, casi piramidal y más tarde, redondeada o irregular, con las ramas abiertas y ramillas lampiñas y pegajosas.

Las hojas de 4 a 10 cm, con peciolo bien desarrollado, de color verde oscuro por el haz, y más claro por el envés, donde suele llevar mechones de pelillos en el encuentro de los nervios. Son de forma redondeada, elípticas u obovadas, de borde sinuoso, recorrido por numerosos dientecillos y terminación roma o escotada. Son de filotaxis alterna, y al principio son muy pegajosas, lo mismo que las ramillas.

El aliso es una especie monoica, las flores masculinas, constituidas por 4 sépalos y 4 estambres, están agrupadas en inflorescencias amentáceas (racimo de cimas en dicasio), con tres flores por bráctea. Estas inflorescencias miden entre 5 y 12 cm de largo, siendo primero erectas y, de maduras, péndulas. Las flores femeninas están constituidas por un gineceo súpero sincárpico de 2 carpelos rematados por un estilo y dos estigmas rojizos; se agrupan en inflorescencias semejantes a las de las flores masculinas, de aspecto ovoide, que cuando maduran quedan leñosas y ennegrecidas.

La fenología es variable, pero suelen florecer de febrero a abril, y maduran los frutos a final del otoño, manteniéndose mucho tiempo en el árbol.

Su área de distribución es relativamente amplia (Europa, Asia y NW de Africa). Forma bosques en galería en ríos y riberas, fondos de valle, lugares inundados y laderas húmedas, hasta los 1700 m.

1.5. *Pinus pinea* L.

El pino piñonero, *Pinus pinea* L., se encuentra encuadrado taxonómicamente en el orden Pinales, dentro de la familia Pinaceae. Es un árbol robusto, con ramillas delgadas, de color castaño claro, perennifolio, que presenta una ramificación verticilada más o menos regular, en la parte de arriba; tiene un sistema radical bien desarrollado, y alcanza hasta 30 m de altura.

El tronco es derecho, cilíndrico, con corteza muy gruesa de color pardo-grisáceo, profundamente agrietada, desprendiéndose en gruesas capas que dejan al descubierto capas nuevas de color pardo rojizo muy vivo. Su madera es resinosa, de albura clara y duramen algo rojizo. La copa es aparasolada en árboles adultos, y redondeada en los ejemplares jóvenes.

Las hojas son aciculares, de color verde claro, algo rígidas y punzantes, de 10 a 20 cm de largo, y de 1 a 23 mm de grosor, agrupadas de dos en dos por medio de una pequeña vaina membranosa que las rodea en la base, que es en realidad un diminuto braquiblasto, con dos o más canales resinífieros.

El pino es una especie monoica. Los conos masculinos son alargados, subcilíndricos, de hasta 15 mm de longitud, agrupados en la parte terminal de las ramillas, de color amarillo o pardo

amarillento con escamas polínicas redondeadas y dentadas en el borde. Los femeninos se presentan en forma de piña, solitarias o agrupadas en grupos de 2 ó 3, grandes (8 a 14 cm de largo y 7 a 10 cm de ancho), aovadas o globosas, de color pardo-rojizo y lustrosas; las escamas están ensanchadas hacia el ápice, con escudete ancho, romboidal, algo prominente, de color grisáceo en el centro; cada una lleva dos grandes piñones de 15 a 20 mm de largo, aovado-oblongos, aplanados en su cara inferior, de color pardo-oscuro o negruzcos, con un ala ancha y muy corta que se desprende con mucha facilidad.

Florece de marzo a mayo y maduran las piñas al tercer año, diseminando los piñones en la primavera del cuarto año.

Crece en suelos frescos y profundos, principalmente en los sueltos y arenosos, incluso en los arenales marítimos y dunas fijas; prefiere a los silíceos, pero vive bien en los calizos sino son muy pesados y arcillosos. Requiere luz abundante y un clima algo cálido, no soportando las heladas fuertes y continuadas. Vive desde el nivel del mar hasta los 1000 m de altitud.

El epíteto específico, *pinea*, es el nombre latino de la piña y quiere destacar la producción por esta especie de piñones comestibles. Aparte de su consumo directo también se utiliza en confitería, culinaria, fabricación de embutidos, en medicina natural, como balsámico contra enfermedades respiratorias. Es importante su acción protectora en suelos arenosos, especialmente contribuyendo a fijar las dunas subcosteras, y permite obtener rendimiento forestal en terrenos estériles, poco o nada productivos.

1.6. Plan de trabajo y objetivos

En esta Memoria se continúa el estudio de las cepas de *B.pumilus* (CECT 5105) y *B.licheniformis* (CECT 5106), que en condiciones axénicas demostraron tener un fuerte efecto estimulador del crecimiento sobre el aliso (Probanza *et al.*, 1996). El análisis de los medios de cultivo reveló la presencia de hormonas de tipo auxina (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996). Sin embargo, los incrementos de los parámetros biométricos registrados no podían justificarse solamente por las hormonas de tipo auxina, lo que sugería la presencia de otros mecanismos responsables del efecto.

En vista de los resultados, se plantea el estudio de estas bacterias desde dos puntos de vista, por una parte, un análisis más profundo del medio de cultivo en busca de los posibles reguladores del crecimiento vegetal, y por otra, el estudio del efecto de cada cepa sobre el crecimiento vegetal, aplicándola directamente sobre el sustrato en condiciones controladas, para evaluar su capacidad PGPR.

Con estos objetivos, el estudio se estructura en tres partes bien diferenciadas:

* inoculación de *A.glutinosa* con *B. pumilus* y *B.licheniformis*, en condiciones no axénicas, en dos suelos distintos, evaluando la influencia de la inoculación sobre la producción primaria del aliso. Además, se ensayarán las bacterias sobre *A. glutinosa* y sobre otra planta leñosa, *P. pinea*, en otro

soporte, típico de producción en vivero, turba arena, eliminando la competencia con otros microorganismos mediante esterilización. En todos los casos se evalúa la capacidad de colonización de ambas cepas y la incidencia de la inoculación en la producción primaria de ambas especies, en todos los sustratos.

* estudio del efecto del inóculo sobre la fisiología de la planta y las modificaciones que introduce el aliso, vía exudados, en la rizosfera. Se recogerán los exudados de los mismos alisos inoculados con ambas cepas, crecidos en dos suelos distintos, procedentes del experimento descrito en el apartado anterior, y se analizarán los exudados y suelo rizosférico.

* Se profundiza en la caracterización de metabolitos promotores del crecimiento liberados por las bacterias al medio de cultivo.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

2. MATERIALES Y MÉTODOS

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Las cepas empleadas en esta Memoria proceden de una población natural de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn situada en San Martín de Valdeiglesias. Las cepas se aislaron durante un período de muestreo de un año, se clasificaron a nivel de género bacteriano, y según las actividades de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno que eran capaces de realizar (Acero *et al*., 1994). Así mismo, se realizaron pruebas biológicas con todas las cepas aisladas, lo que permitió identificar algunas especialmente activas sobre el crecimiento de las plantas (Probanza , 1994). Las pruebas biológicas se realizaron en condiciones de laboratorio, incorporando el medio de crecimiento de las bacterias libre de éstas, al soporte inerte en el que crecieron las plantas junto con la disolución nutritiva.

Los medios de cultivo biológicamente más activos procedían de dos aislados pertenecientes al género *Bacillus*, que por técnicas microbiológicas clásicas se identificaron como *B. pumilus* y *B. licheniformis* (Probanza *et al.*, 1996). Dichas cepas se encuentran actualmente depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con los números CECT 5105 y 5106, respectivamente. El empleo de técnicas moleculares (PCR-RAPDs) demostró que estos aislados eran cepas perfectamente distinguibles de otras de la misma especie, procedentes de la CECT. Como parte de este estudio se detectaron por cromatografía de gases ciertos compuestos auxinoides que podrían justificar algunos de los efectos observados en las pruebas biológicas anteriormente comentadas. Como consecuencia de los resultados previos, estas cepas se consideraron como posibles PGPRs (bacterias promotoras del crecimiento vegetal).

Con el fin de comprobar la actividad de las bacterias y su potencialidad como PGPRs, se diseñaron los experimentos que se describen en esta Memoria. Estos experimentos se plantearon para estudiar el efecto de dichas cepas sobre la producción primaria de *Alnus glutinosa* en condiciones de laboratorio, sobre suelo no estéril en competencia con otros microorganismos, comprobando también su actividad sobre el reciclado de nutrientes. Así mismo, se diseñaron experimentos con objeto de comprobar si la actividad promotora del crecimiento es extensible al propio aliso en otras condiciones y a otras especies leñosas, lo que se testó sobre *Pinus pinea*, dado su interés en reforestación.

La metodología experimental seguida en el estudio de la producción primaria se describe en los Apartados 2.1 (aliso, condiciones de laboratorio) y 2.2 (aliso y pino, condiciones de invernadero), mientras que la metodología empleada en la parte referente a las condiciones fisicoquímicas de la rizosfera y al análisis de exudados se describe en el Apartado 2.3. En la Figura 2.1. aparece resumido el protocolo general de trabajo.

Por último, se estudió la producción de posibles metabolitos responsables de la promoción de crecimiento vegetal en los medios bacterianos (Apartado 2.4.)

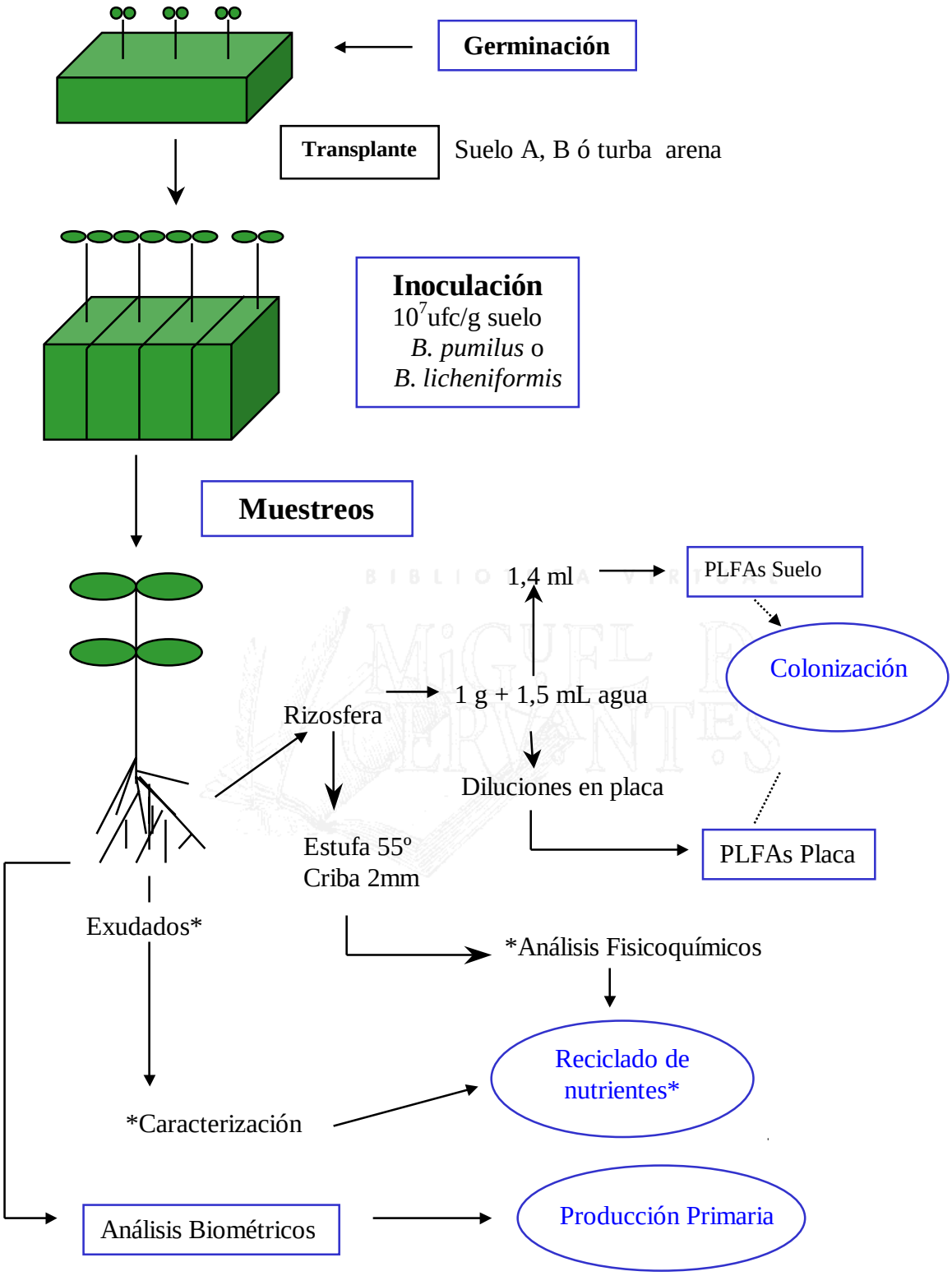


Figura 2.1. Protocolo general de trabajo seguido para la toma de muestras. Estudios de colonización y efectos biológicos. * Sólo en condiciones de laboratorio.

2.1. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en condiciones de laboratorio

2.1.1. Procedencia de las semillas empleadas en las experiencias

Las semillas de *Alnus glutinosa* se recogieron de la aliseda situada en el Arroyo de las Tórtolas, en San Martín de Valdeiglesias (Madrid, coordenadas 30TUK778691) y se caracterizaron en un trabajo previo mediante análisis de proteínas de reserva (Probanza *et al*., 1996).

2.1.2. Recogida y caracterización de los suelos empleados en el experimento

En este estudio se utilizaron dos suelos distintos, muestreados dentro de la Comunidad de Madrid. El suelo **A** se tomó de la aliseda del Arroyo de las Tórtolas que se mencionó anteriormente, y el suelo **B** se recogió en las parcelas de experimentación de la Universidad San Pablo CEU, situadas en el Campus de Montepríncipe.

El suelo **A** se trata de un suelo con un pH 6,36, con capacidad de retención máxima 0,5 mL / g, un contenido en amonio y nitrato de 0,51 µg / g suelo y 9,4 µg / g suelo, respectivamente y una textura arcillo arenosa (53 % arena, 24 % arcilla y 23 % limos). La climatología del lugar se caracteriza por unas precipitaciones anuales de 600 a 1000 mm y una temperatura media anual de 9 a 12 ºC.

El suelo **B** se trata de un suelo con un pH 8,01, con capacidad de retención máxima 0.36 mL/g, un contenido en amonio y nitrato de 0,24 µg/ g suelo y 4,05 µg/ g de suelo, respectivamente, y una textura franco arcillosa (29 % de arena, 41 % de arcillas y 30 % de limos). La zona se caracteriza climatológicamente por tener un ombroclima seco (Rivas Martínez *et al.*, 1987), con unas precipitaciones medias anuales de 400 a 600 mm y una temperatura media entre 10 y 12 ºC

La metodología empleada en los análisis de la caracterización fisicoquímica de los suelos se describe más adelante, en el apartado 2.3.1. de Materiales y Métodos.

2.1.3. Obtención y condiciones de crecimiento de plántulas de *A. glutinosa*. Ensayos de inoculación. Recogida y preparación de muestras

Después de un período de vernalización a 4 ºC en humedad durante 15 días, las semillas se esterilizaron con una disolución de agua:hipoclorito sódico (4:1, v/v) durante 1 min, lavando a continuación 3 veces con agua destilada estéril durante 10 min. Se distribuyeron en una bandeja con vermiculita estéril, llevándola a capacidad de retención máxima (CRM) con agua destilada; se taparon con un film transparente poroso, y se dejaron en cámara de cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura (16/8 h luz/oscuridad y 22 ºC/ 18 ºC, 70 % HR) hasta que desarrollaron los cotiledones y la primera hoja. Durante este período de tiempo se

regaron alternativamente con solución de Hoagland y agua destilada, hasta que se transplantaron a recipientes (14,5 x 4,5 x 4,5 cm) (ACUDAM, España) de 200 g de capacidad, rellenos de vermiculita; se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, luz y humedad y riegos hasta que desarrollaron la cuarta hoja.

Los suelos **A** y **B** se dispusieron en los recipientes descritos anteriormente. Las plántulas de aliso se transplantaron cuando tenían los cotiledones y 4 hojas bien desarrolladas. Tras 10 días de aclimatación al nuevo sustrato, se inocularon 12 plántulas por tratamiento: las 2 cepas, *B. pumilus* y *B. licheniformis*, y se dejó un control de 12 plántulas sin inocular. Las inoculaciones se hicieron a pie de planta con suspensiones de 10^8 ufc/g de suelo, suspendiendo los riegos 2 días antes y 2 días después, y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones controladas de luz y temperatura anteriores. Se regaron con agua destilada hasta pesada constante durante todo el experimento, manteniendo el 70 % de la CRM.

Se determinaron cuatro tiempos de muestreo, 24 h después de la inoculación (T0), a las 2 semanas (T1), a las 6 semanas (T2) y a las 8 semanas (T3) de la inoculación. Se muestrearon 3 plantas por tratamiento en cada tiempo de muestreo, constituyendo cada planta una réplica. Una vez seleccionadas las tres plantas de cada tratamiento al azar, se sacaban del recipiente del recipiente donde crecían, se agitaban suavemente para quitar el suelo rizosférico íntimamente adherido a sus raíces; una parte del suelo rizosférico se cribó por 2 mm y se secó a 55 ºC para su posterior análisis fisicoquímico y otra parte se destinó a análisis microbiológicos. Para dichos análisis, se tomó 1 g de rizosfera, que se resuspendió en 1,5 mL de agua destilada estéril; esta disolución se agitó vigorosamente y se tomaron 100 µL, preparando una batería de suspensiones diluciones en agua destilada de la 10^{-1} a la 10^{-10}; el volumen restante se reservaba para el análisis de PLFAs totales (PLFAs de suelo). De cada dilución se sembraron 50 µL en un medio que contenía 23,5 g de agar para métodos estándar (Pronadisa), 50 mL de solución salina de Winogradsky doble concentrada (apéndice A), 1 mL de solución de oligoelementos (Pochon y Tardieux, 1962) (Apéndice A), 10 mL de extracto de suelo (apéndice A) y agua destilada hasta 1 L. Las placas se sembraron por duplicado y se incubaron a 28 ºC durante 24 h. Aquellas placas que presentaban crecimiento abundante, pero con las colonias aisladas (aproximadamente las correspondientes a la dilución 10^{-3}) se destinaban para el análisis de PLFAs de bacterias cultivables (PLFAs de placa). Paralelamente, las plantas se prensaron para su posterior análisis de imagen (apartado 2.1.5.) (Figura 2.2)

Como resumen, podemos puntualizar que en cada caso se realizaron los siguientes análisis:

1) Monitorización de la inoculación mediante análisis del perfil de ácidos grasos (PLFAs) (Apartado 2.1.4.)

2) Análisis biométricos de las plantas: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. (Apartado 2.1.5.)

3) Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos (Apartado 2.3.1.)

4) Caracterización fisicoquímica y bioquímica de exudados (Apartado 2.3.2.).

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

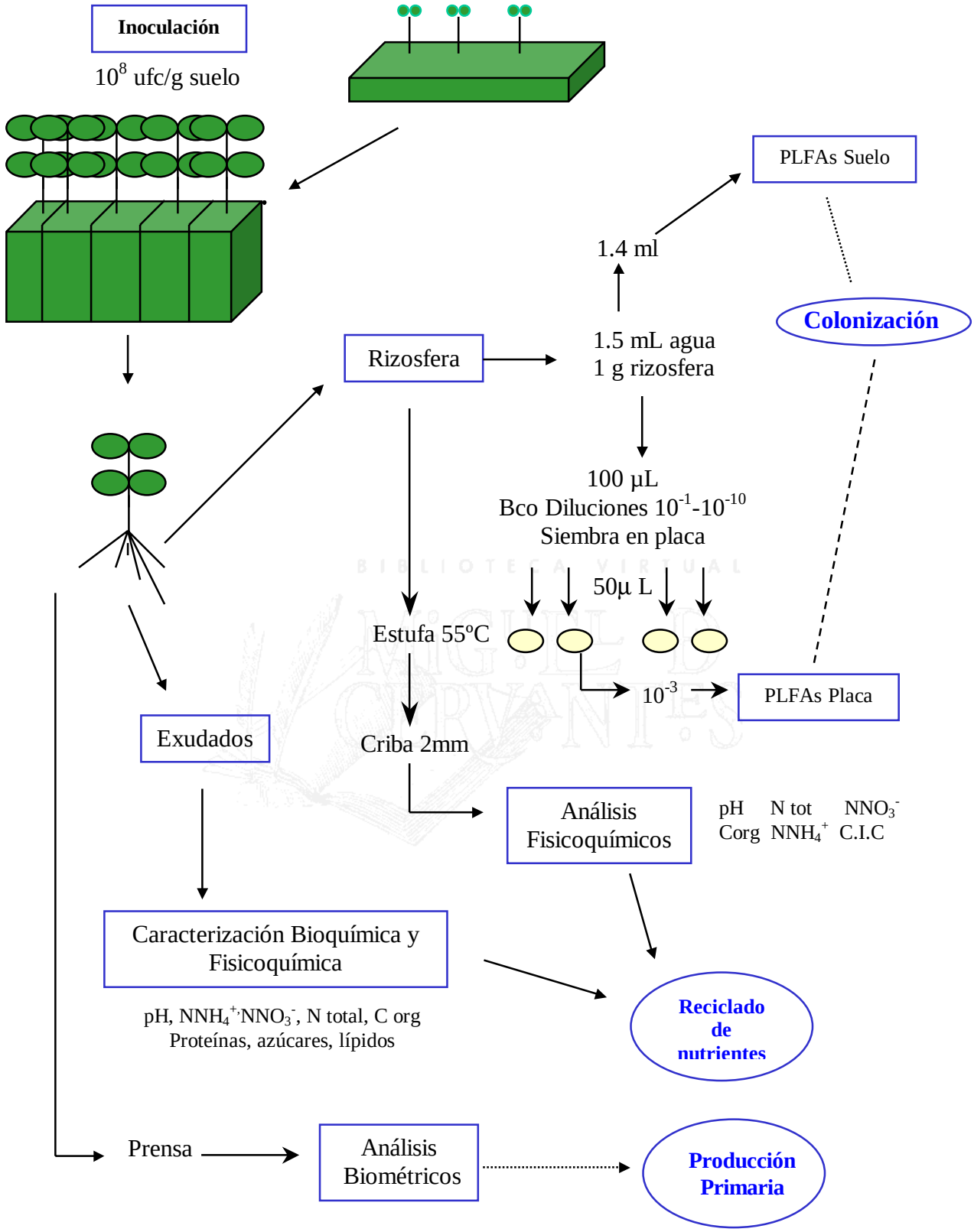


Figura 2.2. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de laboratorio.

2.1.4. Monitorización de las inoculaciones mediante el perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos

Se realizaron controles de la inoculación mediante el análisis del perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos de membrana (PLFAs) a las 24 h (T0), 2 (T1), 6 (T2) y 8 (T3) semanas de la inoculación. La metodología seguida en el análisis de PLFAs, tanto extraidos directamente de suelo rizosférico (PLFAs de suelo) como a partir de las bacterias crecidas en placa (PLFAs de placa), se describe a continuación.

Se hizo un doble análisis, uno con muestras de suelo rizosférico directamente (PLFAs suelo), y otro con las muestras tomadas de placas que presentaban un crecimiento bacteriano adecuado (PLFAs de placa) según se ha descrito en el Apartado 2.1.3. El protocolo (Frostegard *et al*, 1991) consta de cuatro etapas: extracción de lípidos totales, fraccionamiento, metilación y análisis por cromatografía de gases, que se detallan a continuación. Todos los disolventes orgánicos utilizados son de grado HPLC (Merck) y todo el material de vidrio se utilizó libre de lípidos, para lo cual se mantuvieron durante 4 h a 400 ºC.

2.1.4.1. Extracción de lípidos totales

La preparación de las muestras para la extracción de lípidos es distinta según el origen de las mismas. Para preparar las muestras de PLFAs de suelo se resuspendió 1 g de suelo rizosférico en 1,5 mL de agua destilada en tubos de centrífuga de plástico. El análisis de PLFAs de placa, se realiza con las placas en las que se aprecia un crecimiento adecuado (colonias contables), resuspendiendo las colonias bacterianas en 1,5 mL de tampón citrato 0,15 M pH 4, recogiendo la suspensión mediante una micropipeta con puntas cortadas. A partir de este momento las muestras destinadas al análisis de PLFAs de suelo y de placa se procesaron de la misma manera: se añadieron 1,9 mL de cloroformo, 3,75 mL de metanol y 2 mL del reactivo de Bligh y Dyer (B&D) (cloroformo:metanol:tampón citrato 0,15 M a pH 4 (1:2:0.8 v/v/v)); después de agitar, se dejó reposar durante 2 h, tras las cuales se centrifugaron las muestras en frío (4ºC) a 1800*xg* durante 10 min. Se volvió a extraer el precipitado con otros 2,5 mL del reactivo B&D, uniendo ambos sobrenadantes después de centrifugar. En las muestras de PLFAs de placa, no es necesaria la doble extracción con centrifugado, pasándose directamente a la cromatografía de reparto que se detalla a continuación, tras dejar reposar 5 h.

Se añadieron 3,1 mL de cloroformo y 3,1 mL de tampón citrato 0,15 M pH 4, se agitó en vortex durante 1 min dejándolo reposar en oscuridad a temperatura ambiente al menos 8 h. Transcurrido este tiempo, se tomaron 3,0 mL de la fase orgánica (inferior) y se transfirieron a tubos Pyrex, donde se evaporaron a sequedad en flujo de nitrógeno a 40 ºC. El residuo seco se mantuvo a –20 ºC hasta su posterior fraccionamiento (Frostegard *et al*., 1991).

2.1.4.2. Fraccionamiento

En esta etapa se separan los distintos tipos de lípidos en orden creciente de polaridad. Esta separación se realizó en columnas de vidrio rellenas de ácido silícico (tamaño de poro 60-200, Sigma, St. Louis, MO), que debe activarse previamente a 120 ºC durante al menos 1 h. Las columnas de vidrio se prepararon de la siguiente forma: se taponó con un poco de lana de vidrio y se lavó con 5 mL de cloroformo:metanol (1:1, v/v) y 5 mL de cloroformo absoluto, descartándose ambos eluatos. A continuación se cargó cada columna, con ayuda de una pipeta Pasteur, con 0,5 g del ácido silícico activado, previamente resuspendido en unos 10 mL de cloroformo, cuidando que no quedaran burbujas.

Una vez preparadas las columnas, se resuspendió el residuo seco en 100 µL de cloroformo, se agitó en vortex 30s y se aplicó directamente sobre la columna, lavando dos veces con 100µL de cloroformo. A continuación se eluyeron los lípidos neutros con 5 mL de cloroformo, los glicolípidos con 20 mL de acetona, descartando ambos eluatos; por último se recogieron los fosfolípidos en tubos Pyrex, pasando por la columna 5 mL de metanol. Este eluato se evaporó bajo flujo de nitrógeno, a 40 ºC. El residuo se mantuvo a –20 ºC hasta su posterior metilación.

2.1.4.3. Metanolisis alcalina

El residuo seco se disolvió en 1 mL de tolueno:metanol (1:1, v/v), agitando durante 30 s. A continuación se añade 1 mL de KOH 0.5 M en metanol y se incuba en baño acuoso a 37 ºC, durante 15 min. Cuando la mezcla se enfría, se añaden 0,3 mL de ácido acético 1 M, 2 mL de H_2O miliQ y 2 mL de tolueno y se agita en vortex durante 1 min., se centrifugan a 4 ºC, 5000*xg* durante 10 min. La fase orgánica se transfiere a tubos Pyrex y se repite la extracción en la fase acuosa con otros 2 mL de tolueno. Se evapora a sequedad a temperatura ambiente (Dowling *et al.*, 1986), en flujo de nitrógeno añadiendo 50 µL de una disolución del ácido metil-nonadecanoico (C19) de 0,023 mg/mL en tolueno, como patrón externo.

El residuo transesterificado se resuspendió en 100 µL de hexano, y se inyectaron 30 µL en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de 50 m HP-5 (fenil metil silicona) y 0,25 µm d.i.. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Tª inyector: 230 ºC; Tª detector; 270 ºC; Tª horno en gradiente, de 80 ºC durante 1 min, hasta 160 ºC a una velocidad de 20 ºC/min y hasta 270 ºC a una velocidad de 5 ºC/min. El contragradiente de temperatura hasta 80 ºC, a 20 ºC/min.

2.1.4.4. Nomenclatura de los ácidos grasos

Los ácidos grasos se designaron por el número total de átomos de carbono, seguido por el número de dobles enlaces y su posición, tomando como referencia el grupo metilo del final de la cadena. Las configuraciones cis y trans se señalan con las letras *c* y *t* respectivamente, los prefijos *i* y *a* indican las ramificaciones iso y anteiso, y *br* indica que no se conoce la posición de la ramificación; *10Me* indica un grupo metilo en el carbono número 10 contando desde el grupo carboxilo terminal; y *cy* indica que es un ácido graso ciclado (Frostegard *et al*., 1993).

2.1.5. Análisis biométrico de las plantas

En cada momento de muestreo se tomaron tres plantas por tratamiento, se prensaron y se midieron los siguientes parámetros biométricos: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. Estas medidas se realizaron con un analizador de imagen Delta-T, sistema Dias II.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.1.6. Tratamiento de la información

Los resultados obtenidos en esta parte del experimento se trataron como se describe a continuación.

2.1.6.1. Tratamiento de la información obtenida en el análisis de los ácidos grasos

Se hizo una ordenación de los valores medios de los datos, mediante un análisis de componentes principales ACP (Harman, 1967), con objeto de descomponer la varianza total de la muestra en una serie de factores de variación, donde quedó reflejada la importancia de cada una de las variables, así como la influencia del conjunto de variables en la dispersión de las muestras analizadas. Las matrices sobre las que se realizan los ACPs se describen en el capítulo de Resultados (Apartado 3.1.2)

2.1.6.2. Tratamiento de la información obtenida en el análisis biométrico

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional, con réplicas y dos factores de variación: tiempo de muestreo y bacteria inoculada, incluyendo el control. Cuando las variables influyeron significativamente al nivel del 95 %, se procedió a la comparación de la media por el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

2.2. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *Alnus glutinosa* y *Pinus pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en invernadero

2.2.1. Procedencia de semillas empleadas en las experiencias

Las semillas de *Alnus glutinosa* se obtuvieron como se describe en el apartado 2.1.1. Las semillas de *Pinus pinea* fueron adquiridas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", Dirección General de Consevación de la Naturaleza (ICONA)

2.2.2. Caracterización del sustrato empleado

El experimento realizado en invernadero se llevó a cabo en una mezcla de turba:arena (1:1, v/v). La turba utilizada era marca Flora gard (100-300 mg/L N, 100-300 mg/L P_2O_5-fosfatos, 100-400 mg/L K_2O- óxido potasio). La mezcla se sometió a tres ciclos de esterilización en autoclave a 120 ºC durante 20 min.

2.2.3. Obtención y condiciones de crecimiento de plántulas de *A. glutinosa* y *P. pinea*. Ensayo de inoculación. Recogida y preparación de muestras

Las plántulas de aliso se obtuvieron como se ha descrito anteriormente (Apartado 2.1.3.) y se transplantaron a la mezcla de turba-arena estéril (1:1) cuando tenían 4 hojas bien desarrolladas, en el mes de Mayo, llevándolas a un invernadero de policarbonato (7 x 6 x 3 m). Se mantuvieron durante 1 mes con 2 riegos de 10 min diarios hasta finales de Julio, cuando se inocularon con los mismos tratamientos y con la misma densidad bacteriana que en el experimento descrito anteriormente (2.1.3.). Se suspendieron los riegos 2 días antes y 2 días después de la inoculación. En este experimento se trabajó con 3 réplicas (cada una de ellas constituida por 4 plantas), por tratamiento y tiempo de muestreo.

Para obtener las plántulas de pino se esterilizaron las semillas superficialmente con hipoclorito sódico (20 g/L) y se aclararon 5 veces con agua destilada estéril. Se sembraron en bandejas de plástico de 21 x 32 x 7 cm, previamente esterilizadas con alcohol al 96 %, sobre vermiculita (termita nº3) estéril. Las bandejas se llevaron a CRM con agua destilada, y se mantuvieron a ese nivel mediante pesada diaria, en el laboratorio, hasta que se produjo la germinación, con fotoperíodo natural durante el mes de Mayo.

Las semillas de pino recién germinadas se transplantaron a pots individuales (14,5 x 4,5 x 4,5 cm) rellenos de la mezcla de turba:arena estéril y se trasladaron al mismo invernadero que los alisos a principios de Junio. Se mantuvieron con dos riegos de 2 minutos en días alternos durante el mes de Junio, pasando a ser diarios en el mes de Julio. Como en el caso del aliso, antes de realizar la inoculación en las mismas condiciones, se suspendían los riegos 2 días antes y 2 después. Se muestrearon 3 plantas por tratamiento en cada momento de muestreo.

Los tiempos de muestreo que se determinaron para ambas especies fueron 24 h después de la inoculación (T0), 4 semanas (T1) y 8 semanas después del primer inóculo (T2). La inoculación se repitió en aliso después de muestrear en T1.

En todos los tiempos se realizaron los siguientes análisis:

1) monitorización de la colonización mediante el análisis del perfil de ácidos grasos (PLFAs). (Apartado 2.2.4.)

2) análisis biométrico de las plantas: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. (Apartado 2.2.5.)

La recogida y preparación de muestras se realizó según se ha descrito en 2.1.3., variando solamente el número de plantas por réplica y por tratamiento. La figura 2.3. muestra el protocolo seguido en esta parte del estudio.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

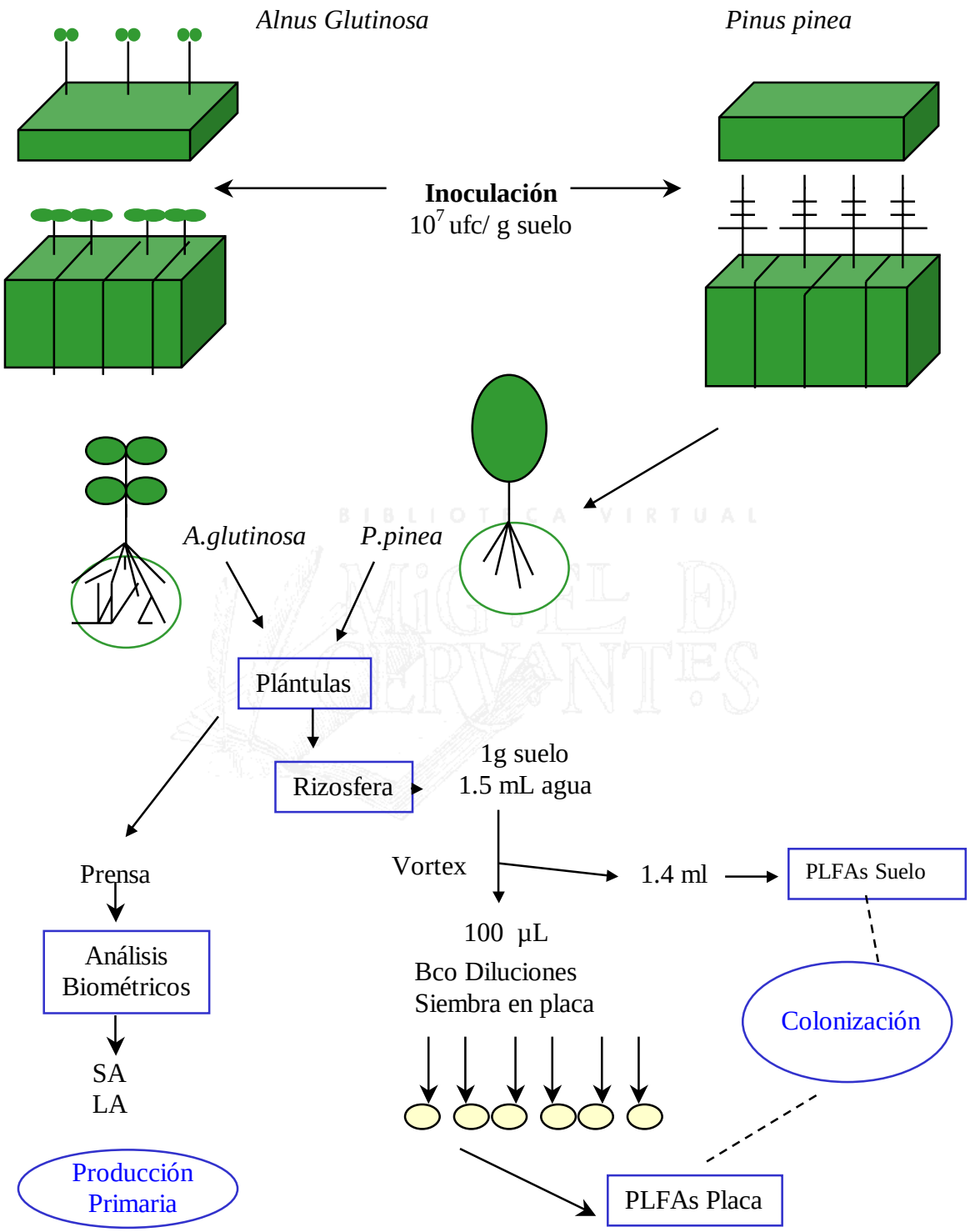


Figura 2.3. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de invernadero

2.2.4. Monitorización de las inoculaciones

La monitorización de las inoculaciones se hizo mediante el perfil de PLFAs en suelo y en placa, según se describe en 2.1.4. tanto para *A.glutinosa* como para *P. pinea*. En el caso del aliso, se realiza un análisis adicional en T1, antes de realizar la segunda inoculación.

2.2.5. Análisis biométricos de las plantas

En cada momento de muestreo se tomaron 12 plantas de aliso por tratamiento, estando cada réplica constituida por 4 plantas, que se prensaron para valorar los siguientes parámetros biométricos: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. En el caso de pino, se tomaron 3 plantas por tratamiento, constituyendo cada planta una réplica Estas medidas se realizaron con un analizador de imagen Delta-T, sistema Dias II.

2.2.6. Tratamiento de la información

Los datos obtenidos en esta parte del experimento se procesaron según se describe a continuación.

BIBLIOTECA VIRTUAL

2.2.6.1. Tratamiento de la información obtenida en el análisis de los ácidos grasos

Se hizo una ordenación de los valores medios de los datos, mediante un análisis de componentes principales ACP (Harman, 1967), con el objeto de descomponer la varianza total de la muestra en una serie de factores de variación, donde quedó reflejada la importancia de cada una de las variables, así como la influencia del conjunto de variables en la dispersión de las muestras analizadas. Las matrices sobre las que se realizan los ACPs se describen en el capítulo de Resultados (Apartados 3.1.2 y 3.2.2)

2.2.6.2. Tratamiento de la información obtenida en el análisis biométrico

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional y con réplicas y dos factores de variación: tiempo de muestreo y bacteria inoculada, incluyendo el control. Cuando los factores de variación influyeron significativamente al nivel del 95 %, se procedió a la comparación de la media por el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

2.3. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* sobre la exudación radical y su incidencia en características fisicoquímicas edáficas

El protocolo experimental seguido en esta parte del trabajo y la obtención de muestras se ilustra en la Figura 2.2.

Según se detalla en este esquema, se recogió el suelo rizosférico en cada momento de muestreo de plantas inoculadas y no inoculadas, se secó a 55 ºC y se caracterizó como se describe en el apartado 2.3.1. Los tiempos de muestreo coinciden con los descritos en el apartado 2.1. en condiciones de laboratorio, T0 a las 24 h de la inoculación, 2 (T1), 6 (T2) y 8 semanas (T3). Además, en cada momento de muestreo, se extrajeron los exudados radicales (figura 2.4) y se caracterizaron según se describe en el Apartado 2.3.2.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.3.1. Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos de *A.glutinosa*

En cada tiempo de muestreo se caracterizó el suelo rizosférico de plántulas de *A. glutinosa* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, y no inoculadas (control), crecidas en los suelos **A** (aliseda) y **B** (parcelas). Se realizaron los siguientes análisis: pH, nitrogeno amonio, nitrógeno nitrato, nitrógeno total, carbono orgánico y capacidad de intercambio catiónico.

2.3.1.a. Medida del pH

Se realizó frente a agua destilada. Se mezclaron 5 g de tierra con 5 mL de agua destilada, agitándose durante 20 min. Se dejó reposar y se midió con un pHmetro Crison 2001, provisto de un electrodo combinado de virio modelo Radiometer GK 2401.

2.3.1.b. Determinación de nitrógeno amonio

Se agitaron 2 g de suelo en 20 mL de KCl 2M a 300 rpm durante 1 h (Sahrawat, 1982). Tras otra hora de reposo, se valoró el ion amonio en el extracto filtrado siguiendo el método de Berthelot, modificado por Weatherburn (Weatherburn, 1967; Vollbrecht *et al*., 1989; Hecht y Mohr, 1990). A continuación se describe el método detalladamente.

Se tomaron 10 mL del extracto transparente y se añadieron 0,4 mL de una solución alcohólica de fenol al 10 %, 0,4 mL de nitroprusiato sódico al 0,5 % y 1 mL de solución oxidante (citrato sódico: hipoclorito sódico, 4:1 v/v). Se agitó en vórtex y se dejó reposar durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro Mitlon Roy modelo Spectronic 20.

Los datos obtenidos se interpolaron en una recta patrón construída a partir de diluciones sucesivas de una patrón de 100 ppm de NH_4Cl. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.1.c. Determinación de nitrógeno nitrato

Se agitaron 2 g de suelo en 10 mL de KCl 0,1M a 300 rpm durante 10 min. Se dejó reposar y se filtró el extracto por papel de filtro. Se determinó la concentración de nitrógeno nitrato por fotocolorimetría con un fotómetro Merck 502130/SQ118. Los nitratos reaccionan con el nitrospectal para dar un nitrocompuesto de color rojo intenso.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.3.1.d. Determinación de nitrógeno total

Las muestras de suelo se sometieron a digestión según el método de Kjeldhal (1883) y posteriormente se valoró el ion amonio producido mediante el método colorimétrico de Smith (1980). A continuación se describe el método detalladamente.

Se tomaron 2 g de suelo y se le añadieron 25 mL de H_2SO_4 concentrado y se llevó a cabo la digestión en un digestor de microondas focalizadas Maxidigest 350 (Prolabo), a 500 ºC durante 25 min, tiempo durante el cual se fueron añadiendo de forma automática 15 mL de H_2O_2 como catalizador oxidante, de forma que todo el nitrógeno pasara a la forma $(NH_4)_2SO_4$. Una vez frío, se tomaron 50 µL del digerido y se añadieron 12,5 mL de una solución al 0,12 % de EDTA, 1 mL del reactivo A (nitroprusiato sódico al 0,5 % y fenol en solución alcohólica al 10 % en proprocion 1:1) y 1,25 mL de reactivo B (tampón fosfato (26,84g de $Na_2HPO_4.12H_2O$, 20,64 g de NaOH y 1000 mL de agua destilada) e hipoclorito sódico al 1,5 %, en proporción 4:1, v/v); la mezcla se llevó a pH 10 con sosa 10 M. Después de agitar cada 15 min durante 1 h , se midió la absorbancia en un fotómetro Merck modelo 502130/SQ118 a 635 nm.

2.3.1e. Determinación de carbono orgánico

Se pesaron 2 g de suelo y se mantuvieron a 400 ºC en horno Mufla durante 4 h. El porcentaje de carbono se halla por diferencia de peso (Forster, 1995)

2.3.1.f. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Se utilizó el método descrito por Chung y Zasoski (1994). Se basa en la saturación del suelo con un catión índice (amonio), el lavado del exceso de sales y en la determinación del catión índice retenido.

Se pesan 2 g de suelo en un tubo de centrífuga y se lavan con 8 mL de acetato amónico 1N pH 7. Se agitan en vórtex durante 4 min y se centrifuga 5 min a 1800*xg*; este paso se repite 4 veces.

Se lava el precipitado con 8 mL de etanol, agitándolo suavemente durante 2 min. Se centrifuga 5 minutos a 1800*xg*, se tira el sobrenadante y al precipitado se le añaden 10 mL de NaCl al 10 %. Se agita en vortex 4 min y se repite 4 veces el lavado con NaCl al 10 %. El sobrenadante se filtra y se enrasa a 50 mL con agua destilada.

En una probeta de 100 mL se ponen 2,5 mL del extracto anterior, 2 mL de tartrato sódico al 10 % y se lleva con agua destilada hasta 90 mL; se pasa esta mezcla a un vaso de precipitados y mientras que se agita suavemente, se añaden 5 mL del reactivo de Nessler A. Se lleva a la probeta y se enrasa hasta 100 mL con agua destilada. A los 25 min se mide la absorbancia a 405 nm en un fotómetro Merck modelo 502130/SQ118.

Los datos obtenidos se interpolan en una recta patrón, construída a partir de diluciones sucesivas de una disolución estándar de 1 meq/L de NH_4Cl. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.1.g. Determinación de la textura

La textura del suelo se determinó por el método de Boyoucos. Este método se basa en la dispersión de las partículas en un medio líquido, utilizando una disolución acuosa de metafosfato sódico y carbonato sódico en cantidad suficiente para obtener una concentración 0,5 N de sodio. Previamente, se eliminó la materia orgánica de la muestra por tratamiento con peróxido de hidrógeno, filtración y lavado con agua destilada. Mediante el densímetro de Boyoucos se comprueba la densidad de la suspensión a tiempos determinados y aplicando la ecuación de Stokes se obtiene el diámetro de las partículas sedimentadas (Day, 1965)

2.3.1.h. Determinación de la capacidad de retención máxima (C.R.M.)

Se determinó por el método de García Trejo (1981). Las muestras de suelo se secaron a 110 ºC durante 24 h. Posteriormente, se dispusieron 5 g de tierra sobre algodón hidrófobo en un embudo. Para conocer el valor de la CRM se añade agua destilada gota a gota mediante una bureta sobre el montaje antes descrito, hasta que cae del embudo la primera gota. El volumen de agua empleado es la CRM expresado en mL/g.

2.3.2. Obtención y caracterización de los exudados

La metodología seguida para la obtención y caracterización de exudados se describe a continuación.

2.3.2.1. Obtención de los exudados

Se realizó según el método de Ström *et al*. (1994) (Figura 2.4.).

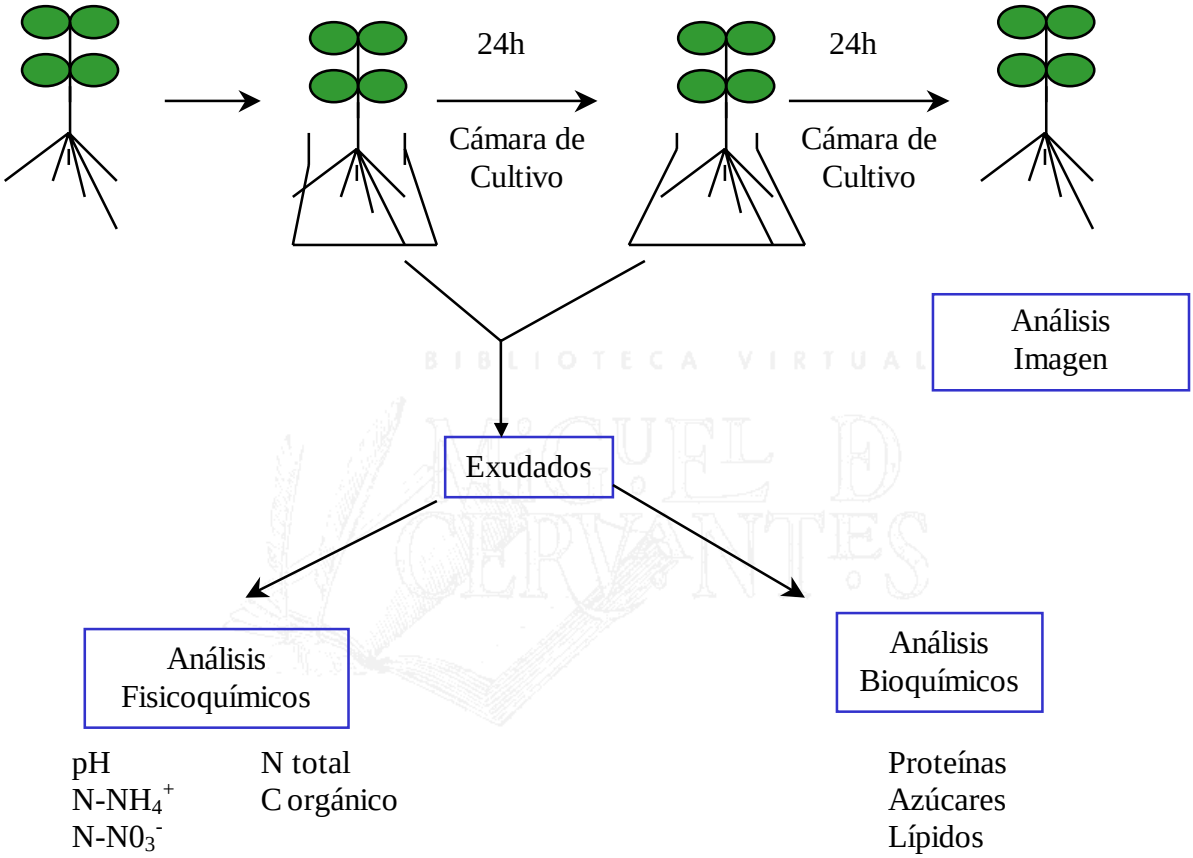


Figura 2.4. Protocolo de obtención y caracterización de exudados

Se pusieron las raíces de plantas limpias de suelo en matraces Erlenmeyer de 25 ó 100 mL, dependiendo del tamaño de la planta, que contenían 60 ó 100 mL de agua destilada, respectivamente. Se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas (16/8 h luz/oscuridad y 22 ºC/18 ºC, 70 % HR) durante 24 h, y en ese momento se pasaron a matraces Erlenmeyer con agua destilada estéril fresca y se mantuvieron otras 24 h. Se unieron los exudados recogidos, se filtraron al vacío por filtros millipore de 0.4µm, se repartieron en alícuotas y se congelaron a –20 ºC para su posterior análisis.

2.3.2.2. Caracterización de los exudados

Los exudados se sometieron a análisis fisicoquímicos y bioquímicos. A continuación

pasamos a describir la metodología empleada en cada caso.

2.3.2.2.1. Análisis fisicoquímicos

Los exudados se sometieron a los siguientes análisis: pH, nitrógeno amonio, nitrógeno nitrato, nitrogeno total y carbono orgánico.

2.3.2.2.1.a. Medida del pH

Se realizó sobre el volumen total de exudados filtrados antes de congelar. Se midió según se describe en 2.3.1.a.

2.3.2.2.1.b. Determinación de nitrógeno amonio

Se valoró el ión amonio en 5 mL de exudados siguiendo el método de Berthelot, modificado por Weatherburn (Weatherburn, 1967; Vollbrecht *et al.*, 1989; Hecht y Mohr, 1990), según se describe en 2.3.1.b.

2.3.2.2.1.c. Determinación de nitrógeno nitrato

Se determinó la concentración de nitrógeno nitrato en 1.5 mL según se describe en 2.3.1.c.

2.3.2.2.1.d. Determinación de nitrógeno total

Se determinó según se ha descrito en 2.3.1.d. para los suelos, modificando la cantidad de material de partida, 1 mL de exudados, en lugar de 2 g de suelo, y añadiendo 15 mL de SO_4H_2.

2.3.2.2.1.e. Determinación de carbono orgánico

Se empleó el método de Walkley y Black (1943) modificado. Dicho método se basa en la oxidación del material fácilmente oxidable con dicromáto potásico. La muestra de exudados se trató con un exceso de oxidante y la proporción gastada de éste se determinó valorando por retroceso con una solución de sulfato ferroso.

A 1 mL de exudados se le añadieron 15 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y 20 mL de H_2SO_4 concentrado, agitando la mezcla 1 min y dejándola reposar media hora. A continuación, se diluyó con 200 mL de agua destilada, con objeto de facilitar la observación del punto final de la titulación. Se añadieron 25 mL de H_3PO_4 al 50% (v/v) para hacer más patente el viraje y 10 gotas de difenilamina sulfúrica (10 g de $NH(C_6H_5)_2$, 1000 mL de H_2SO_4 y 200 mL de agua destilada) como indicador. Se valoró con $FeSO_4$ 0.5 N por retroceso. Simultáneamente se preparó un control con agua, para valorar los productos oxidantes de los reactivos.

Para calcular el procentaje de carbono orgánico de las muestras, se consideró que 1 mL de $K_2Cr_2O_7$ es equivalente a 0.003 g de carbono y que el método es efectivo en un 75 %, por lo cual el factor de corrección al 100 % es de 1.33 (García Trejo, 1981)

2.3.2.2.2. Análisis bioquímicos

La caracterización bioquímica de exudados se centró en los principios inmediatos: azúcares, proteínas y lípidos. A continuación pasamos a describir la metodología empleada en cada caso.

2.3.2.2.2.a. Determinación de azúcares

Para la determinación de azúcares utilizamos el método de la antrona (Loewus, 1952).

Se tomaron 1.5 mL de exudados y se añadió 3 mL de una solución recién preparada de antrona al 0,2 % en ácido sulfúrico concentrado (12N). Se mantienen al baño maría durante 10 min. Es estas condiciones, el ácido sulfúrico reacciona con los azúcares rindiendo 5-hidroxi-metil furfural, que con la antrona rinde una coloración verde, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glúcidos. Se deja enfriar y se mide la absorbancia a 540 nm, que determina el contenido de glúcidos solubles en etanol.

Los datos obtenidos se interpolaron en una recta patrón de glucosa (10–100 μg/mL) y los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.2.2.2.b. Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron según el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Se tomó 1 mL de exudados y se añadieron 5 mL de la solución A + B (50:1, v/v) (Apéndice A). Tras 15 min a temperatura ambiente, se añaden 0.5 mL del reactivo de Folin 1/3 y a los 30 min se mide la absorbancia a 500 nm. Cuando las muestras están poco concentradas, se lee la absorbancia a 740 nm.

Se construyó una curva de calibrado con 10 concentraciones de ovoalbúmina (0-0,9 mg/mL) y los valores se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.2.2.2.c. Determinación de lípidos

El análisis cualitativo de lípidos se llevó a cabo siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959). A 4 mL de exudados se le añadieron 2 mL de cloroformo y 5 mL de metanol (disolventes grado HPLC), agitándose la mezcla durante 2 min. Se añadieron otros 3 mL de cloroformo y tras agitar 2 min, se centrifugó durante 5 min a 1800*xg* y se repitió la extracción en la fase acuosa. Se mezclaron las fases orgánicas, tratándolas con $NaSO_4$ para eliminar el agua y se pasaron a un tubo B-29 de peso conocido, donde se evaporó a sequedad. El porcentaje de lípidos se obtiene por la diferencia de peso.

El residuo seco se resuspendió en 200 µL de cloroformo y se desarrolló una cromatografía en capa fina, con fase estacionaria de sílice, Orbisil 60-20 de 20 x 20 cm (Orbital Europa S.A.), junto a 4 patrones: colesterol, lecitina, ácido palmítico y tripalmitato al 10 % en cloroformo. La cromatografía se desarrolló en cubeta de vidrio, usando como fase móvil hexano:éter dietílico:ácido acético (70:30:1, v/v/v). Se reveló en otra cubeta de vidrio con atmósfera saturada de cristales de yodo.

2.3.3. Tratamiento de la información

El tratamiento de los datos obtenidos en esta parte del experimento se describe a continuación.

2.3.3.1. Tratamiento de los resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVAs) bidireccional con réplicas y dos factores de variación, tiempo de muestreo y tratamiento (bacteria inoculada y control). Con el fin de evaluar la influencia global del tratamiento, se realizó la media de los cuatro tiempos de muestreo para cada parámetro. Cuando la variable tratamiento influyó significativamente al nivel del 95 % según el ANOVA, se procedió a la comparación de la media mediante el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

2.3.3.2. Tratamiento de los resultados de la caracterización de los exudados

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional con réplicas y dos factores de variación, tiempo de muestreo y tratamiento (bacteria inoculada y control). Con el fin de evaluar la influencia global del tratamiento, se realizó la media de los cuatro tiempos de muestreo para cada parámetro. Cuando la variable tratamiento influyó significativamente al nivel del 95 % según el ANOVA, se procedió a la comparación de las medias por el test estadístico LSD (Sokal y Rohlf, 1979)

2.4. Materiales y métodos empleados en la caracterización de giberelinas producidas por las cepas de *B. pumilus* y *B. licheniformis*

Los resultados obtenidos en los trabajos previos a este estudio indicaron que además de los compuestos de naturaleza auxinoide mencionados en la introducción de este apartado, podían existir otros compuestos que, de alguna forma alteraban considerablemente no sólo el desarrollo del sistema radical, sino también el de la parte aérea, y por tanto, alteraban la actividad fisiológica general de la planta (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996). Como principal responsable de este efecto se emprendió el estudio de la producción de giberelinas.

Las giberelinas son reguladores del crecimiento vegetal, y entre los muchos efectos que provocan se encuentra la elongación de los entrenudos caulinares. El ensayo biológico característico de este tipo de reguladores es el de reversión de la enanización, aplicando una solución de giberelinas exógenas en el ápice caulinar de plantas enanas. Una vez realizada la prueba biológica, se procede a cuantificar y caracterizar las giberelinas presentes en el medio de cultivo bacteriano utilizado para revertir la enanización.

2.4.1. Pruebas biológicas

En primer lugar se enanizaron plántulas de aliso sanas con un inhibidor de la síntesis de giberelinas a nivel de la síntesis del ent-kaureno, paclobutrazol (PCB) (Rademacher, 1991). Se prepararon las plántulas como se describe en 2.1.3. Para enanizar las plantas, uno de los riegos se hizo con una solución de 100 ppm de PCB, transplantando todas las plántulas a los 15 y 30 días a vermiculita nueva. Se regaron con agua destilada y solución de Hoagland alternativamente, mientras que se mantuvieron en vermiculita.

A los 2 meses en los que se confirmó la enanización de las plantas tratadas frente a plantas control, se transplantaron a suelo de la aliseda (caracterizado en 2.3.1.) y se aplicaron microgotas del medio de cultivo de *B. pumilus*, *B. licheniformis* y GA_3, en el ápice caulinar de las plantas enanas (3 plantas por concentración ensayada en cada tratamiento), dejando un lote de plantas enanas como control. Se repitió la dosis a las 24 h.

Los medios de cultivo aplicados sobre el ápice caulinar de las plantas enanas se concentraron previamente 10, 20, 40 y 80 veces, según el siguiente protocolo. Se inocularon 5 matraces Erlenmeyer con 200 mL de caldo nutritivo con cada bacteria y se incubaron durante 24 h a 28 ºC en agitación a 400 rpm en un agitador orbital con campana UNIHOOD 500. Se centrifugaron a 5000*xg* durante 20 min y se eliminaron las células en suspensión restantes por filtración (Millipore 0.2 µm de diámetro). Se llevó a pH 2,5 con HCl 6N, y se hizo una doble extracción (1:1, v/v) con acetato de etilo evaporando a sequedad en rotavapor. Se resuspendió en 20, 10, 5 y 2.5 mL de acetato de etilo para concentrarlo 10, 20, 40 y 80 veces respectivamente y se extrajo (1:1, v/v) con tampón fosfato 0,1M (pH 8,5), añadiendo unas gotas

de Tween 20 (Sigma, St.Louis, MO) como mojante. Paralelamente, se prepararon las soluciones de GA_3 en tampón fosfato 0,1M (pH 8,5) en concentraciones de 5, 20 y 40 ppm y se aplicaron de la misma forma.

La dosis tanto de GA_3 como de medio de cultivo bacteriano se repitió 1 semana después de la primera aplicación. A las 2 semanas del comienzo del experimento (1ª aplicación), se prensaron las plantas y se realizó el análisis de imagen con un sistema Delta T-sistema DIAS II. Se midieron: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea, superficie radical, longitud del brote, superficie aérea del brote y número de hojas del brote.

2.4.2. Tratamiento de la información

Se realizaron rectas de regresión (parámetros medidos frente a concentraciones) y las diferencias se analizaron por análisis de la varianza bidireccionales (ANOVAs); cuando las diferencias resultaron significativas ($p<0,05$) se realizó un LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.4.3. Caracterización de giberelinas por cromatografia de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis de giberelinas en los medios de cultivo por GC-MS requiere una exhaustiva preparación de la muestra, que se puede dividir en cuatro etapas: purificación, metilación, sililación e identificación. La cuantificación se realiza posteriormente.

Los análisis de GAs se realizaron en dos extracciones partiendo de distintos volúmenes, 10 mL para la cuantificación y 190 mL para la identificación de giberelinas en medio de cultivo de *Bacillus* sp., filtrado por 0.2 µm. Todos los análisis se repitieron al menos 2 veces. Se siguió el siguiente protocolo.

2.4.3.1. Purificación

Las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro. Se llevó la muestra a pH 2,5 y se realizó un reparto frente a acetato de etilo (3x, 1:1, (v/v)). La fracción orgánica resultante se repartió frente a agua a pH 2,5 (2x, 20:1, (v/v)), obteniéndose la fracción ácida de acetato de etilo donde se encuentran la mayoría de las GAs libres. Esta fracción se evaporó a sequedad.

A continuación se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en una columna de QAE-Sephadex A-25 (15 x 1 cm d.i.). El polvo de Sephadex se mezcló con acetato de sodio 1 M, se agitó y se dejó reposar la mezcla durante 15 min, descartando el acetato de sodio; esta operación se repitió 5 veces. Posteriormente, el polvo de Sephadex se almacenó en ácido acético 1N a 4 ºC. De esta solución se depositaron 15 mL en la columna, y ésta se equilibró con agua a pH 8,5 (Talón y Zeevaart, 1990).

El extracto seco se resuspendió en unas gotas de MeOH al 100 % y se añadieron 2 mL de agua a pH 8,5. La muestra se aplicó a la columna y se añadieron 15 ml de agua a pH 8,0. Posteriormente se eluyeron las GAs con 20 mL de ácido acético 1N. El volumen de ácido acético se redujo a 5 mL y la muestra se purificó mediante cartuchos Sep-Pak C_{18}.

El cartucho Sep-Pak se lavó mediante jeringuilla con 5 mL de MeOH (100 %) y posteriormente se pasaron 5 mL de agua a pH 2,5. A continuación se añadieron los 5 mL de muestra y se realizaron sucesivos lavados con 5 mL de ácido acético 1N y agua destilada. Las GAs se recuperaron en un eluato metanólico al 80 % (Talón *et al*, 1990) que se evaporó a sequedad.

Las muestras secas se resuspendieron en 2.5 mL de metanol al 20 % añadiendo 1 μg de ácido abscísico (ABA) como estándar de referencia del volumen de retención. Las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro y se separaron en un cromatógrafo Waters HPLC. Se utilizó una columna análitica Hypersil C_{18} (250 x 4,6 mm, 10 μm d.i.), unida a una precolumna también C_{18}. Se utilizó un gradiente lineal de 40 min del 20 al 100 % de MeOH, con agua acidulada con ácido acético al 1 %, a un flujo de 1 mL/min.

Los volúmenes de elución de las GAs se determinaron inyectando soluciones de GAs naturales (GA_8, GA_{29}, GA_{81}, GA_3, GA_1, GA_{20}, GA_{44}, GA_{19}, GA_7, GA_4, GA_9 y GA_{24}) y estudiando sus espectros de masas mediante GC-MS. El volumen de elución del ABA se determinó midiendo la absorbancia a 254 nm. De acuerdo con los análisis de las GAs estándares, se recogieron 40 fracciones, a intervalos de 1 min, descartándose las 10 primeras y las 2 últimas. El resto de fracciones se combinaron según los tiempos de retención y se evaporaron a sequedad.

2.4.3.2. Metilación

La metilación se llevó a cabo con diazometano, que se preparó como se describe a continuación. A un frasco destilador en donde se acoplaron un embudo y un frasco receptor, se añadieron 6 g de KOH en 10 mL de agua y 35 mL de carbitol. La temperatura se mantuvo a 80 ºC con un baño de agua en agitación. En el embudo se dispusieron 21,5 g de p-tolilsulfonil-nitrosamida en 125 mL de dietil éter, los cuales se añadieron gota a gota al frasco destilador. El producto final, diazometano, se recogió en el frasco receptor en baño de hielo. A ese frasco se le añadieron previamente 10 mL de dietiléter. Una vez acabada la reacción, el frasco con diazometano se envolvió con papel aluminio y se almacenó a –80ºC.

La metilación de las muestras se realizó resusupendiendo el residuo seco de cada fracción de HPLC en 200 μL de MeOH, sobre el cual se añadió inmediatamente un volumen en exceso de la disolución de diazometano en dietiléter. A los 20 min, se evaporó el éter mediante

ventilación en una campalna de extracción forzada, y luego el MeOH mediante un concentrador a vacío *Speed vaccuum*.

2.4.3.3. Sililación

Las muestras metiladas se resuspendieron 3 veces en 30 µL de MeOH (100 %) y se pasaron a insertos cónicos con capacidad de 200 µL. Las muestras se volvieron a secar a vacío y después se les añadió un volumen de 10 µL del reactivo de sililación, BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoracetamida). La reacción de sililación se dejó progresar al menos 1 h a temperatura ambiente antes de la inyección de la muestra.

2.4.3.4. Identificación de GAs

Las muestras se añalizaron mediante cromatografía de gases en combinación con espectrometría de masas (GS-MS) en modo *full scan*. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Star 3400 Varian). Las muestras (1µL) se co-inyectaron con una mezcla de alcanos (solución de parafilm en hexano) para la obtención de los tiempos relativos de retención (índices de retención de Kovats, KRIs) (Gaskin y McMillan, 1991). Las inyecciones se realizaron automáticamente con un inyector automático (8200 CX Varian) en modo *splitless* utilizando una columna capilar de sílica fundida (DB-5 MS, J&W Scientific) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d.i., a una temperatura de horno de 50 ºC. Después de 1 min, se inició una rampa de ascenso a 30 ºC/min hasta 240 ºC y posteriormente esta temperatura se incrementó hasta 280 ºC con una rampa de 10 ºC/ min. La presión del helio fue de 60 kPa. Las temperaturas del inyector, la interfase y la fuente iónica del espectrómetro de masas fueron 280, 290 y 170 ºC, respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV y el voltaje del multiplicador, el voltaje de amplitud de la modulación axial y la corriente emitida fueron de 1200 V, 4 V y 36 µA, respectivamente. Se utilizó el método de ionización por impacto electrónico (EI) y las condiciones de la GC-MS se testaron periódicamente con inyecciones de un estándar de GA_1 deuterada. Los espectros de masas se adquirieron mediante barridos desde 200 a 600 amu a una velocidad de 1 s por ciclo de barrido. La identificación de GAs se estableció comparando los espectros de masas, los KRIs y los volúmenes de elución en HPLC con los de los estándares naturales (Gaskin y McMillan, 1991).

2.4.4. Cuantificación de GAs

En el proceso de cuantificación de las GAs se utilizaron estándares internos marcados con deuterio. En base a estimas previas, se añadieron distintas concentraciones de estándares internos en extracciones consecutivas, repitiendo este paso hasta que se igualaron las concentraciones de los estándares y las giberelinas presentes en la muestra, requisito

indispensable para la cuantificación (Talón y Zeevaart, 1990). Una vez determinada la cantidad de estandar interno, se llevó a cabo la cuantificación definitiva. Las concentraciones de GA_3 presentes en los extractos se calcularon generando curvas de concentraciones conocidas de GA_3, considerando las pérdidas de GA_1 presentes en la misma fracción que la GA_3. Las estimas de 3-epiGA_1 e iso GA_3 se obtienen comparando las intensidades de los iones con los isómeros correspondientes (GA_1 y GA_3, respectivamente). Los enriquecimientos de dichos estándares se determinaron mediante GC-MS y éstos fueron: [17-$^2H_2$]GA_1, 99.6 %, [17-$^2H_2$]GA_4, 93.3 %, [17-$^2H_2$]GA_{20}, 99.6 %.

Para la cuantificación, se procesaron las muestras como se ha descrito anteriormente, añadiendo los estándares deuterados como estándares internos, inmediatamente antes de la evaporación del extracto metanólico, antes de fraccionar en el HPLC. Las fracciones se agruparon en función del tiempo de retención de las GAs para cuantificar. La metilación y derivatización de estas fracciones se efectuaron según se ha descrito anteriormente para la identificación. Las muestras se analizaron y cuantificaron por GC-MS en modo SIM (Selected Ion Monitoring). Se utilizó un espectrómetro de masas con un analizador tipo cuadrupolo (MD 800 Fisons), acoplado a un cromatógrafo de gases (Fisons GC 8000 series) equipado con una columna similar a la utilizada en la identificación de GAs. Un volumen de 1 a 2 μL de cada muestra se inyectó manualmente en modo *splitless* y el programa de temperatura del horno fue el mismo utilizado para la identificación. La presión del helio fue 85 kPa y las temperaturas del inyector, la interfase y la fuente del MS fueron 250, 250 y 200 ºC, respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV y el tiempo de búsqueda de cada ion fue de 80 ms. Las parejas de iones detectados para los metiltrimetilsilil (MeTMSi) derivados de las GAs fueron los siguientes: (MeTMSi)-GA_1/[$^2H_2$]GA_1 , m/z 506 y 508, (MeTMSi)-GA_4/[$^2H_2$]GA_4 , 284 y 286 m/z , (MeTMSi)-GA_{20}/[$^2H_2$]GA_{20} , 418 y 420 m/z. En cada muestra, la identidad de la mezcla de GAs endógenas y estándares del análisis SIM se comprobó previamente mediante análisis de *full scan* con el cromatógrafo utilizado en las determinaciones cualitativas descrito anteriormente.

Determinación de las cantidades de GAs. Se calculó la relación entre las áreas de los picos de los iones no marcados (T) y las de los marcados (M) en las GAs naturales (Gaskin y MacMillan, 1991). Los porcentajes de pureza de las GAs marcadas se utilizaron para conocer la relación entre el ion marcado (B) y el ion no marcado (A) en los estándares de GAs. La cuantificación se efectuó mediante la fórmula

$$Q= S (BX – AY)/ (TY – MX)$$

En donde

S: cantidad de GA marcada añadida al extracto metanólico

X: % de area del pico de GA no marcada en el medio de cultivo bacteriano

Y: % del área del pico de GA marcada en el medio de cultivo bacteriano

2. MATERIALES Y MÉTODOS

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Las cepas empleadas en esta Memoria proceden de una población natural de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn situada en San Martín de Valdeiglesias. Las cepas se aislaron durante un período de muestreo de un año, se clasificaron a nivel de género bacteriano, y según las actividades de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno que eran capaces de realizar (Acero *et al*., 1994). Así mismo, se realizaron pruebas biológicas con todas las cepas aisladas, lo que permitió identificar algunas especialmente activas sobre el crecimiento de las plantas (Probanza , 1994). Las pruebas biológicas se realizaron en condiciones de laboratorio, incorporando el medio de crecimiento de las bacterias libre de éstas, al soporte inerte en el que crecieron las plantas junto con la disolución nutritiva.

Los medios de cultivo biológicamente más activos procedían de dos aislados pertenecientes al género *Bacillus*, que por técnicas microbiológicas clásicas se identificaron como *B. pumilus* y *B. licheniformis* (Probanza *et al.*, 1996). Dichas cepas se encuentran actualmente depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con los números CECT 5105 y 5106, respectivamente. El empleo de técnicas moleculares (PCR-RAPDs) demostró que estos aislados eran cepas perfectamente distinguibles de otras de la misma especie, procedentes de la CECT. Como parte de este estudio se detectaron por cromatografía de gases ciertos compuestos auxinoides que podrían justificar algunos de los efectos observados en las pruebas biológicas anteriormente comentadas. Como consecuencia de los resultados previos, estas cepas se consideraron como posibles PGPRs (bacterias promotoras del crecimiento vegetal).

Con el fin de comprobar la actividad de las bacterias y su potencialidad como PGPRs, se diseñaron los experimentos que se describen en esta Memoria. Estos experimentos se plantearon para estudiar el efecto de dichas cepas sobre la producción primaria de *Alnus glutinosa* en condiciones de laboratorio, sobre suelo no estéril en competencia con otros microorganismos, comprobando también su actividad sobre el reciclado de nutrientes. Así mismo, se diseñaron experimentos con objeto de comprobar si la actividad promotora del crecimiento es extensible al propio aliso en otras condiciones y a otras especies leñosas, lo que se testó sobre *Pinus pinea*, dado su interés en reforestación.

La metodología experimental seguida en el estudio de la producción primaria se describe en los Apartados 2.1 (aliso, condiciones de laboratorio) y 2.2 (aliso y pino, condiciones de invernadero), mientras que la metodología empleada en la parte referente a las condiciones fisicoquímicas de la rizosfera y al análisis de exudados se describe en el Apartado 2.3. En la Figura 2.1. aparece resumido el protocolo general de trabajo.

Por último, se estudió la producción de posibles metabolitos responsables de la promoción de crecimiento vegetal en los medios bacterianos (Apartado 2.4.)

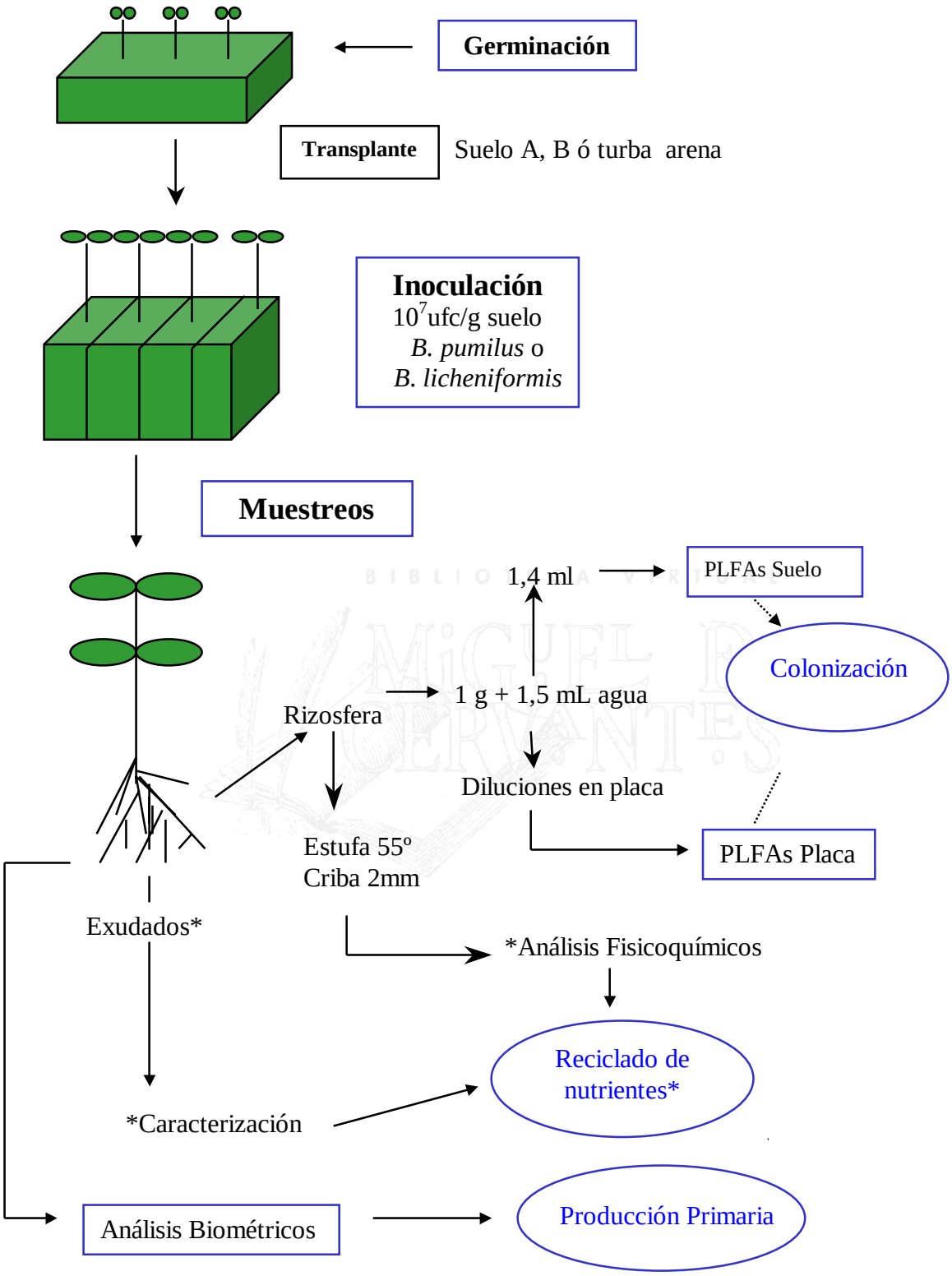


Figura 2.1. Protocolo general de trabajo seguido para la toma de muestras. Estudios de colonización y efectos biológicos. * Sólo en condiciones de laboratorio.

2.1. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en condiciones de laboratorio

2.1.1. Procedencia de las semillas empleadas en las experiencias

Las semillas de *Alnus glutinosa* se recogieron de la aliseda situada en el Arroyo de las Tórtolas, en San Martín de Valdeiglesias (Madrid, coordenadas 30TUK778691) y se caracterizaron en un trabajo previo mediante análisis de proteínas de reserva (Probanza *et al*., 1996).

2.1.2. Recogida y caracterización de los suelos empleados en el experimento

En este estudio se utilizaron dos suelos distintos, muestreados dentro de la Comunidad de Madrid. El suelo **A** se tomó de la aliseda del Arroyo de las Tórtolas que se mencionó anteriormente, y el suelo **B** se recogió en las parcelas de experimentación de la Universidad San Pablo CEU, situadas en el Campus de Montepríncipe.

El suelo **A** se trata de un suelo con un pH 6,36, con capacidad de retención máxima 0,5 mL / g, un contenido en amonio y nitrato de 0,51 µg / g suelo y 9,4 µg / g suelo, respectivamente y una textura arcillo arenosa (53 % arena, 24 % arcilla y 23 % limos). La climatología del lugar se caracteriza por unas precipitaciones anuales de 600 a 1000 mm y una temperatura media anual de 9 a 12 ºC.

El suelo **B** se trata de un suelo con un pH 8,01, con capacidad de retención máxima 0.36 mL/g, un contenido en amonio y nitrato de 0,24 µg/ g suelo y 4,05 µg/ g de suelo, respectivamente, y una textura franco arcillosa (29 % de arena, 41 % de arcillas y 30 % de limos). La zona se caracteriza climatológicamente por tener un ombroclima seco (Rivas Martínez *et al.*, 1987), con unas precipitaciones medias anuales de 400 a 600 mm y una temperatura media entre 10 y 12 ºC

La metodología empleada en los análisis de la caracterización fisicoquímica de los suelos se describe más adelante, en el apartado 2.3.1. de Materiales y Métodos.

2.1.3. Obtención y condiciones de crecimiento de plántulas de *A. glutinosa*. Ensayos de inoculación. Recogida y preparación de muestras

Después de un período de vernalización a 4 ºC en humedad durante 15 días, las semillas se esterilizaron con una disolución de agua:hipoclorito sódico (4:1, v/v) durante 1 min, lavando a continuación 3 veces con agua destilada estéril durante 10 min. Se distribuyeron en una bandeja con vermiculita estéril, llevándola a capacidad de retención máxima (CRM) con agua destilada; se taparon con un film transparente poroso, y se dejaron en cámara de cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura (16/8 h luz/oscuridad y 22 ºC/ 18 ºC, 70 % HR) hasta que desarrollaron los cotiledones y la primera hoja. Durante este período de tiempo se

regaron alternativamente con solución de Hoagland y agua destilada, hasta que se transplantaron a recipientes (14,5 x 4,5 x 4,5 cm) (ACUDAM, España) de 200 g de capacidad, rellenos de vermiculita; se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, luz y humedad y riegos hasta que desarrollaron la cuarta hoja.

Los suelos **A** y **B** se dispusieron en los recipientes descritos anteriormente. Las plántulas de aliso se transplantaron cuando tenían los cotiledones y 4 hojas bien desarrolladas. Tras 10 días de aclimatación al nuevo sustrato, se inocularon 12 plántulas por tratamiento: las 2 cepas, *B. pumilus* y *B. licheniformis*, y se dejó un control de 12 plántulas sin inocular. Las inoculaciones se hicieron a pie de planta con suspensiones de 10^8 ufc/g de suelo, suspendiendo los riegos 2 días antes y 2 días después, y se mantuvieron en cámara de cultivo en las condiciones controladas de luz y temperatura anteriores. Se regaron con agua destilada hasta pesada constante durante todo el experimento, manteniendo el 70 % de la CRM.

Se determinaron cuatro tiempos de muestreo, 24 h después de la inoculación (T0), a las 2 semanas (T1), a las 6 semanas (T2) y a las 8 semanas (T3) de la inoculación. Se muestrearon 3 plantas por tratamiento en cada tiempo de muestreo, constituyendo cada planta una réplica. Una vez seleccionadas las tres plantas de cada tratamiento al azar, se sacaban del recipiente del recipiente donde crecían, se agitaban suavemente para quitar el suelo rizosférico íntimamente adherido a sus raíces; una parte del suelo rizosférico se cribó por 2 mm y se secó a 55 ºC para su posterior análisis fisicoquímico y otra parte se destinó a análisis microbiológicos. Para dichos análisis, se tomó 1 g de rizosfera, que se resuspendió en 1,5 mL de agua destilada estéril; esta disolución se agitó vigorosamente y se tomaron 100 µL, preparando una batería de suspensiones diluciones en agua destilada de la 10^{-1} a la 10^{-10}; el volumen restante se reservaba para el análisis de PLFAs totales (PLFAs de suelo). De cada dilución se sembraron 50 µL en un medio que contenía 23,5 g de agar para métodos estándar (Pronadisa), 50 mL de solución salina de Winogradsky doble concentrada (apéndice A), 1 mL de solución de oligoelementos (Pochon y Tardieux, 1962) (Apéndice A), 10 mL de extracto de suelo (apéndice A) y agua destilada hasta 1 L. Las placas se sembraron por duplicado y se incubaron a 28 ºC durante 24 h. Aquellas placas que presentaban crecimiento abundante, pero con las colonias aisladas (aproximadamente las correspondientes a la dilución 10^{-3}) se destinaban para el análisis de PLFAs de bacterias cultivables (PLFAs de placa). Paralelamente, las plantas se prensaron para su posterior análisis de imagen (apartado 2.1.5.) (Figura 2.2)

Como resumen, podemos puntualizar que en cada caso se realizaron los siguientes análisis:

1) Monitorización de la inoculación mediante análisis del perfil de ácidos grasos (PLFAs) (Apartado 2.1.4.)

2) Análisis biométricos de las plantas: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. (Apartado 2.1.5.)

3) Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos (Apartado 2.3.1.)

4) Caracterización fisicoquímica y bioquímica de exudados (Apartado 2.3.2.).

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

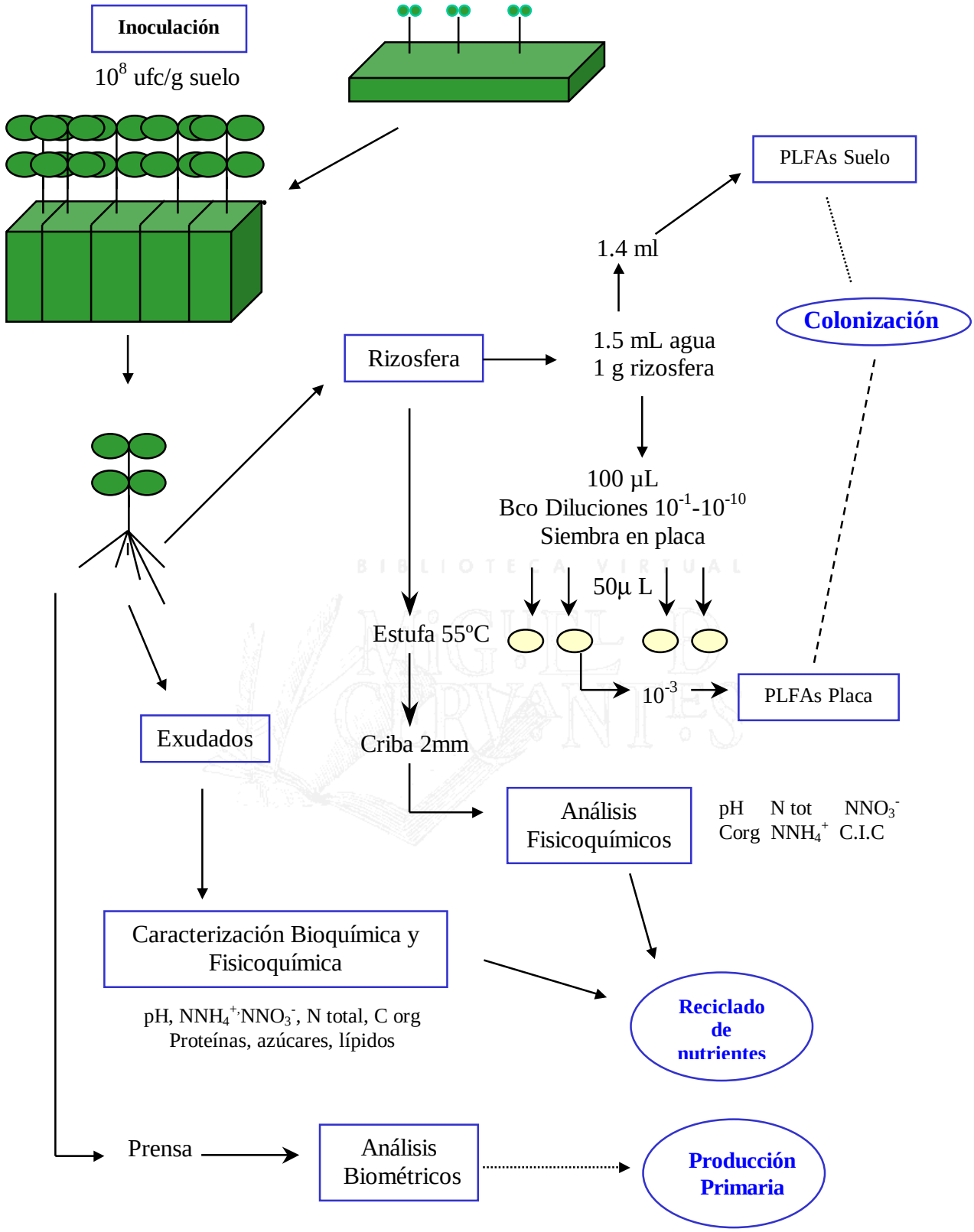


Figura 2.2. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de laboratorio.

2.1.4. Monitorización de las inoculaciones mediante el perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos

Se realizaron controles de la inoculación mediante el análisis del perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos de membrana (PLFAs) a las 24 h (T0), 2 (T1), 6 (T2) y 8 (T3) semanas de la inoculación. La metodología seguida en el análisis de PLFAs, tanto extraidos directamente de suelo rizosférico (PLFAs de suelo) como a partir de las bacterias crecidas en placa (PLFAs de placa), se describe a continuación.

Se hizo un doble análisis, uno con muestras de suelo rizosférico directamente (PLFAs suelo), y otro con las muestras tomadas de placas que presentaban un crecimiento bacteriano adecuado (PLFAs de placa) según se ha descrito en el Apartado 2.1.3. El protocolo (Frostegard *et al*, 1991) consta de cuatro etapas: extracción de lípidos totales, fraccionamiento, metilación y análisis por cromatografía de gases, que se detallan a continuación. Todos los disolventes orgánicos utilizados son de grado HPLC (Merck) y todo el material de vidrio se utilizó libre de lípidos, para lo cual se mantuvieron durante 4 h a 400 ºC.

2.1.4.1. Extracción de lípidos totales

La preparación de las muestras para la extracción de lípidos es distinta según el origen de las mismas. Para preparar las muestras de PLFAs de suelo se resuspendió 1 g de suelo rizosférico en 1,5 mL de agua destilada en tubos de centrífuga de plástico. El análisis de PLFAs de placa, se realiza con las placas en las que se aprecia un crecimiento adecuado (colonias contables), resuspendiendo las colonias bacterianas en 1,5 mL de tampón citrato 0,15 M pH 4, recogiendo la suspensión mediante una micropipeta con puntas cortadas. A partir de este momento las muestras destinadas al análisis de PLFAs de suelo y de placa se procesaron de la misma manera: se añadieron 1,9 mL de cloroformo, 3,75 mL de metanol y 2 mL del reactivo de Bligh y Dyer (B&D) (cloroformo:metanol:tampón citrato 0,15 M a pH 4 (1:2:0.8 v/v/v)); después de agitar, se dejó reposar durante 2 h, tras las cuales se centrifugaron las muestras en frío (4ºC) a 1800*xg* durante 10 min. Se volvió a extraer el precipitado con otros 2,5 mL del reactivo B&D, uniendo ambos sobrenadantes después de centrifugar. En las muestras de PLFAs de placa, no es necesaria la doble extracción con centrifugado, pasándose directamente a la cromatografía de reparto que se detalla a continuación, tras dejar reposar 5 h.

Se añadieron 3,1 mL de cloroformo y 3,1 mL de tampón citrato 0,15 M pH 4, se agitó en vortex durante 1 min dejándolo reposar en oscuridad a temperatura ambiente al menos 8 h. Transcurrido este tiempo, se tomaron 3,0 mL de la fase orgánica (inferior) y se transfirieron a tubos Pyrex, donde se evaporaron a sequedad en flujo de nitrógeno a 40 ºC. El residuo seco se mantuvo a –20 ºC hasta su posterior fraccionamiento (Frostegard *et al*., 1991).

2.1.4.2. Fraccionamiento

En esta etapa se separan los distintos tipos de lípidos en orden creciente de polaridad. Esta separación se realizó en columnas de vidrio rellenas de ácido silícico (tamaño de poro 60-200, Sigma, St. Louis, MO), que debe activarse previamente a 120 ºC durante al menos 1 h. Las columnas de vidrio se prepararon de la siguiente forma: se taponó con un poco de lana de vidrio y se lavó con 5 mL de cloroformo:metanol (1:1, v/v) y 5 mL de cloroformo absoluto, descartándose ambos eluatos. A continuación se cargó cada columna, con ayuda de una pipeta Pasteur, con 0,5 g del ácido silícico activado, previamente resuspendido en unos 10 mL de cloroformo, cuidando que no quedaran burbujas.

Una vez preparadas las columnas, se resuspendió el residuo seco en 100 µL de cloroformo, se agitó en vortex 30s y se aplicó directamente sobre la columna, lavando dos veces con 100µL de cloroformo. A continuación se eluyeron los lípidos neutros con 5 mL de cloroformo, los glicolípidos con 20 mL de acetona, descartando ambos eluatos; por último se recogieron los fosfolípidos en tubos Pyrex, pasando por la columna 5 mL de metanol. Este eluato se evaporó bajo flujo de nitrógeno, a 40 ºC. El residuo se mantuvo a –20 ºC hasta su posterior metilación.

2.1.4.3. Metanolisis alcalina

El residuo seco se disolvió en 1 mL de tolueno:metanol (1:1, v/v), agitando durante 30 s. A continuación se añade 1 mL de KOH 0.5 M en metanol y se incuba en baño acuoso a 37 ºC, durante 15 min. Cuando la mezcla se enfría, se añaden 0,3 mL de ácido acético 1 M, 2 mL de H_2O miliQ y 2 mL de tolueno y se agita en vortex durante 1 min., se centrifugan a 4 ºC, 5000*xg* durante 10 min. La fase orgánica se transfiere a tubos Pyrex y se repite la extracción en la fase acuosa con otros 2 mL de tolueno. Se evapora a sequedad a temperatura ambiente (Dowling *et al.*, 1986), en flujo de nitrógeno añadiendo 50 µL de una disolución del ácido metil-nonadecanoico (C19) de 0,023 mg/mL en tolueno, como patrón externo.

El residuo transesterificado se resuspendió en 100 µL de hexano, y se inyectaron 30 µL en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de 50 m HP-5 (fenil metil silicona) y 0,25 µm d.i.. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Tª inyector: 230 ºC; Tª detector; 270 ºC; Tª horno en gradiente, de 80 ºC durante 1 min, hasta 160 ºC a una velocidad de 20 ºC/min y hasta 270 ºC a una velocidad de 5 ºC/min. El contragradiente de temperatura hasta 80 ºC, a 20 ºC/min.

2.1.4.4. Nomenclatura de los ácidos grasos

Los ácidos grasos se designaron por el número total de átomos de carbono, seguido por el número de dobles enlaces y su posición, tomando como referencia el grupo metilo del final de la cadena. Las configuraciones cis y trans se señalan con las letras *c* y *t* respectivamente, los prefijos *i* y *a* indican las ramificaciones iso y anteiso, y *br* indica que no se conoce la posición de la ramificación; *10Me* indica un grupo metilo en el carbono número 10 contando desde el grupo carboxilo terminal; y *cy* indica que es un ácido graso ciclado (Frostegard *et al*., 1993).

2.1.5. Análisis biométrico de las plantas

En cada momento de muestreo se tomaron tres plantas por tratamiento, se prensaron y se midieron los siguientes parámetros biométricos: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. Estas medidas se realizaron con un analizador de imagen Delta-T, sistema Dias II.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.1.6. Tratamiento de la información

Los resultados obtenidos en esta parte del experimento se trataron como se describe a continuación.

2.1.6.1. Tratamiento de la información obtenida en el análisis de los ácidos grasos

Se hizo una ordenación de los valores medios de los datos, mediante un análisis de componentes principales ACP (Harman, 1967), con objeto de descomponer la varianza total de la muestra en una serie de factores de variación, donde quedó reflejada la importancia de cada una de las variables, así como la influencia del conjunto de variables en la dispersión de las muestras analizadas. Las matrices sobre las que se realizan los ACPs se describen en el capítulo de Resultados (Apartado 3.1.2)

2.1.6.2. Tratamiento de la información obtenida en el análisis biométrico

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional, con réplicas y dos factores de variación: tiempo de muestreo y bacteria inoculada, incluyendo el control. Cuando las variables influyeron significativamente al nivel del 95 %, se procedió a la comparación de la media por el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

2.2. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *Alnus glutinosa* y *Pinus pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en invernadero

2.2.1. Procedencia de semillas empleadas en las experiencias

Las semillas de *Alnus glutinosa* se obtuvieron como se describe en el apartado 2.1.1. Las semillas de *Pinus pinea* fueron adquiridas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", Dirección General de Consevación de la Naturaleza (ICONA)

2.2.2. Caracterización del sustrato empleado

El experimento realizado en invernadero se llevó a cabo en una mezcla de turba:arena (1:1, v/v). La turba utilizada era marca Flora gard (100-300 mg/L N, 100-300 mg/L P_2O_5-fosfatos, 100-400 mg/L K_2O- óxido potasio). La mezcla se sometió a tres ciclos de esterilización en autoclave a 120 ºC durante 20 min.

2.2.3. Obtención y condiciones de crecimiento de plántulas de *A. glutinosa* y *P. pinea*. Ensayo de inoculación. Recogida y preparación de muestras

Las plántulas de aliso se obtuvieron como se ha descrito anteriormente (Apartado 2.1.3.) y se transplantaron a la mezcla de turba-arena estéril (1:1) cuando tenían 4 hojas bien desarrolladas, en el mes de Mayo, llevándolas a un invernadero de policarbonato (7 x 6 x 3 m). Se mantuvieron durante 1 mes con 2 riegos de 10 min diarios hasta finales de Julio, cuando se inocularon con los mismos tratamientos y con la misma densidad bacteriana que en el experimento descrito anteriormente (2.1.3.). Se suspendieron los riegos 2 días antes y 2 días después de la inoculación. En este experimento se trabajó con 3 réplicas (cada una de ellas constituida por 4 plantas), por tratamiento y tiempo de muestreo.

Para obtener las plántulas de pino se esterilizaron las semillas superficialmente con hipoclorito sódico (20 g/L) y se aclararon 5 veces con agua destilada estéril. Se sembraron en bandejas de plástico de 21 x 32 x 7 cm, previamente esterilizadas con alcohol al 96 %, sobre vermiculita (termita nº3) estéril. Las bandejas se llevaron a CRM con agua destilada, y se mantuvieron a ese nivel mediante pesada diaria, en el laboratorio, hasta que se produjo la germinación, con fotoperíodo natural durante el mes de Mayo.

Las semillas de pino recién germinadas se transplantaron a pots individuales (14,5 x 4,5 x 4,5 cm) rellenos de la mezcla de turba:arena estéril y se trasladaron al mismo invernadero que los alisos a principios de Junio. Se mantuvieron con dos riegos de 2 minutos en días alternos durante el mes de Junio, pasando a ser diarios en el mes de Julio. Como en el caso del aliso, antes de realizar la inoculación en las mismas condiciones, se suspendían los riegos 2 días antes y 2 después. Se muestrearon 3 plantas por tratamiento en cada momento de muestreo.

Los tiempos de muestreo que se determinaron para ambas especies fueron 24 h después de la inoculación (T0), 4 semanas (T1) y 8 semanas después del primer inóculo (T2). La inoculación se repitió en aliso después de muestrear en T1.

En todos los tiempos se realizaron los siguientes análisis:

1) monitorización de la colonización mediante el análisis del perfil de ácidos grasos (PLFAs). (Apartado 2.2.4.)

2) análisis biométrico de las plantas: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. (Apartado 2.2.5.)

La recogida y preparación de muestras se realizó según se ha descrito en 2.1.3., variando solamente el número de plantas por réplica y por tratamiento. La figura 2.3. muestra el protocolo seguido en esta parte del estudio.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

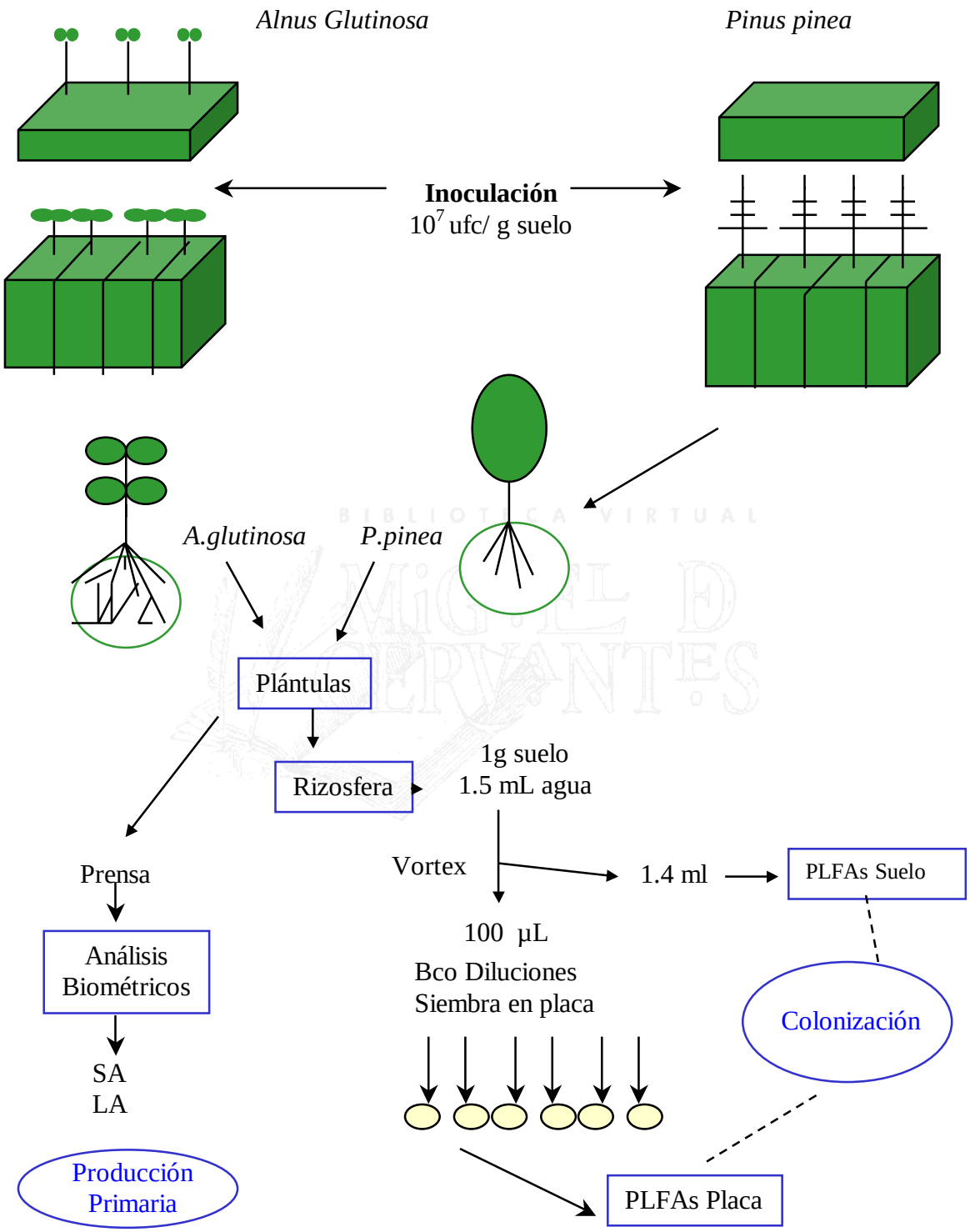


Figura 2.3. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de invernadero

2.2.4. Monitorización de las inoculaciones

La monitorización de las inoculaciones se hizo mediante el perfil de PLFAs en suelo y en placa, según se describe en 2.1.4. tanto para *A.glutinosa* como para *P. pinea*. En el caso del aliso, se realiza un análisis adicional en T1, antes de realizar la segunda inoculación.

2.2.5. Análisis biométricos de las plantas

En cada momento de muestreo se tomaron 12 plantas de aliso por tratamiento, estando cada réplica constituida por 4 plantas, que se prensaron para valorar los siguientes parámetros biométricos: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea y superficie radical. En el caso de pino, se tomaron 3 plantas por tratamiento, constituyendo cada planta una réplica Estas medidas se realizaron con un analizador de imagen Delta-T, sistema Dias II.

2.2.6. Tratamiento de la información

Los datos obtenidos en esta parte del experimento se procesaron según se describe a continuación.

BIBLIOTECA VIRTUAL

2.2.6.1. Tratamiento de la información obtenida en el análisis de los ácidos grasos

Se hizo una ordenación de los valores medios de los datos, mediante un análisis de componentes principales ACP (Harman, 1967), con el objeto de descomponer la varianza total de la muestra en una serie de factores de variación, donde quedó reflejada la importancia de cada una de las variables, así como la influencia del conjunto de variables en la dispersión de las muestras analizadas. Las matrices sobre las que se realizan los ACPs se describen en el capítulo de Resultados (Apartados 3.1.2 y 3.2.2)

2.2.6.2. Tratamiento de la información obtenida en el análisis biométrico

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional y con réplicas y dos factores de variación: tiempo de muestreo y bacteria inoculada, incluyendo el control. Cuando los factores de variación influyeron significativamente al nivel del 95 %, se procedió a la comparación de la media por el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

2.3. Materiales y métodos empleados en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* sobre la exudación radical y su incidencia en características fisicoquímicas edáficas

El protocolo experimental seguido en esta parte del trabajo y la obtención de muestras se ilustra en la Figura 2.2.

Según se detalla en este esquema, se recogió el suelo rizosférico en cada momento de muestreo de plantas inoculadas y no inoculadas, se secó a 55 ºC y se caracterizó como se describe en el apartado 2.3.1. Los tiempos de muestreo coinciden con los descritos en el apartado 2.1. en condiciones de laboratorio, T0 a las 24 h de la inoculación, 2 (T1), 6 (T2) y 8 semanas (T3). Además, en cada momento de muestreo, se extrajeron los exudados radicales (figura 2.4) y se caracterizaron según se describe en el Apartado 2.3.2.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.3.1. Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos de *A.glutinosa*

En cada tiempo de muestreo se caracterizó el suelo rizosférico de plántulas de *A. glutinosa* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, y no inoculadas (control), crecidas en los suelos **A** (aliseda) y **B** (parcelas). Se realizaron los siguientes análisis: pH, nitrogeno amonio, nitrógeno nitrato, nitrógeno total, carbono orgánico y capacidad de intercambio catiónico.

2.3.1.a. Medida del pH

Se realizó frente a agua destilada. Se mezclaron 5 g de tierra con 5 mL de agua destilada, agitándose durante 20 min. Se dejó reposar y se midió con un pHmetro Crison 2001, provisto de un electrodo combinado de virio modelo Radiometer GK 2401.

2.3.1.b. Determinación de nitrógeno amonio

Se agitaron 2 g de suelo en 20 mL de KCl 2M a 300 rpm durante 1 h (Sahrawat, 1982). Tras otra hora de reposo, se valoró el ion amonio en el extracto filtrado siguiendo el método de Berthelot, modificado por Weatherburn (Weatherburn, 1967; Vollbrecht *et al*., 1989; Hecht y Mohr, 1990). A continuación se describe el método detalladamente.

Se tomaron 10 mL del extracto transparente y se añadieron 0,4 mL de una solución alcohólica de fenol al 10 %, 0,4 mL de nitroprusiato sódico al 0,5 % y 1 mL de solución oxidante (citrato sódico: hipoclorito sódico, 4:1 v/v). Se agitó en vórtex y se dejó reposar durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro Mitlon Roy modelo Spectronic 20.

Los datos obtenidos se interpolaron en una recta patrón construída a partir de diluciones sucesivas de una patrón de 100 ppm de NH_4Cl. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.1.c. Determinación de nitrógeno nitrato

Se agitaron 2 g de suelo en 10 mL de KCl 0,1M a 300 rpm durante 10 min. Se dejó reposar y se filtró el extracto por papel de filtro. Se determinó la concentración de nitrógeno nitrato por fotocolorimetría con un fotómetro Merck 502130/SQ118. Los nitratos reaccionan con el nitrospectal para dar un nitrocompuesto de color rojo intenso.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.3.1.d. Determinación de nitrógeno total

Las muestras de suelo se sometieron a digestión según el método de Kjeldhal (1883) y posteriormente se valoró el ion amonio producido mediante el método colorimétrico de Smith (1980). A continuación se describe el método detalladamente.

Se tomaron 2 g de suelo y se le añadieron 25 mL de H_2SO_4 concentrado y se llevó a cabo la digestión en un digestor de microondas focalizadas Maxidigest 350 (Prolabo), a 500 ºC durante 25 min, tiempo durante el cual se fueron añadiendo de forma automática 15 mL de H_2O_2 como catalizador oxidante, de forma que todo el nitrógeno pasara a la forma $(NH_4)_2SO_4$. Una vez frío, se tomaron 50 µL del digerido y se añadieron 12,5 mL de una solución al 0,12 % de EDTA, 1 mL del reactivo A (nitroprusiato sódico al 0,5 % y fenol en solución alcohólica al 10 % en proprocion 1:1) y 1,25 mL de reactivo B (tampón fosfato (26,84g de $Na_2HPO_4.12H_2O$, 20,64 g de NaOH y 1000 mL de agua destilada) e hipoclorito sódico al 1,5 %, en proporción 4:1, v/v); la mezcla se llevó a pH 10 con sosa 10 M. Después de agitar cada 15 min durante 1 h , se midió la absorbancia en un fotómetro Merck modelo 502130/SQ118 a 635 nm.

2.3.1e. Determinación de carbono orgánico

Se pesaron 2 g de suelo y se mantuvieron a 400 ºC en horno Mufla durante 4 h. El porcentaje de carbono se halla por diferencia de peso (Forster, 1995)

2.3.1.f. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Se utilizó el método descrito por Chung y Zasoski (1994). Se basa en la saturación del suelo con un catión índice (amonio), el lavado del exceso de sales y en la determinación del catión índice retenido.

Se pesan 2 g de suelo en un tubo de centrífuga y se lavan con 8 mL de acetato amónico 1N pH 7. Se agitan en vórtex durante 4 min y se centrifuga 5 min a 1800*xg*; este paso se repite 4 veces.

Se lava el precipitado con 8 mL de etanol, agitándolo suavemente durante 2 min. Se centrifuga 5 minutos a 1800*xg*, se tira el sobrenadante y al precipitado se le añaden 10 mL de NaCl al 10 %. Se agita en vortex 4 min y se repite 4 veces el lavado con NaCl al 10 %. El sobrenadante se filtra y se enrasa a 50 mL con agua destilada.

En una probeta de 100 mL se ponen 2,5 mL del extracto anterior, 2 mL de tartrato sódico al 10 % y se lleva con agua destilada hasta 90 mL; se pasa esta mezcla a un vaso de precipitados y mientras que se agita suavemente, se añaden 5 mL del reactivo de Nessler A. Se lleva a la probeta y se enrasa hasta 100 mL con agua destilada. A los 25 min se mide la absorbancia a 405 nm en un fotómetro Merck modelo 502130/SQ118.

Los datos obtenidos se interpolan en una recta patrón, construída a partir de diluciones sucesivas de una disolución estándar de 1 meq/L de NH_4Cl. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.1.g. Determinación de la textura

La textura del suelo se determinó por el método de Boyoucos. Este método se basa en la dispersión de las partículas en un medio líquido, utilizando una disolución acuosa de metafosfato sódico y carbonato sódico en cantidad suficiente para obtener una concentración 0,5 N de sodio. Previamente, se eliminó la materia orgánica de la muestra por tratamiento con peróxido de hidrógeno, filtración y lavado con agua destilada. Mediante el densímetro de Boyoucos se comprueba la densidad de la suspensión a tiempos determinados y aplicando la ecuación de Stokes se obtiene el diámetro de las partículas sedimentadas (Day, 1965)

2.3.1.h. Determinación de la capacidad de retención máxima (C.R.M.)

Se determinó por el método de García Trejo (1981). Las muestras de suelo se secaron a 110 ºC durante 24 h. Posteriormente, se dispusieron 5 g de tierra sobre algodón hidrófobo en un embudo. Para conocer el valor de la CRM se añade agua destilada gota a gota mediante una bureta sobre el montaje antes descrito, hasta que cae del embudo la primera gota. El volumen de agua empleado es la CRM expresado en mL/g.

2.3.2. Obtención y caracterización de los exudados

La metodología seguida para la obtención y caracterización de exudados se describe a continuación.

2.3.2.1. Obtención de los exudados

Se realizó según el método de Ström *et al*. (1994) (Figura 2.4.).

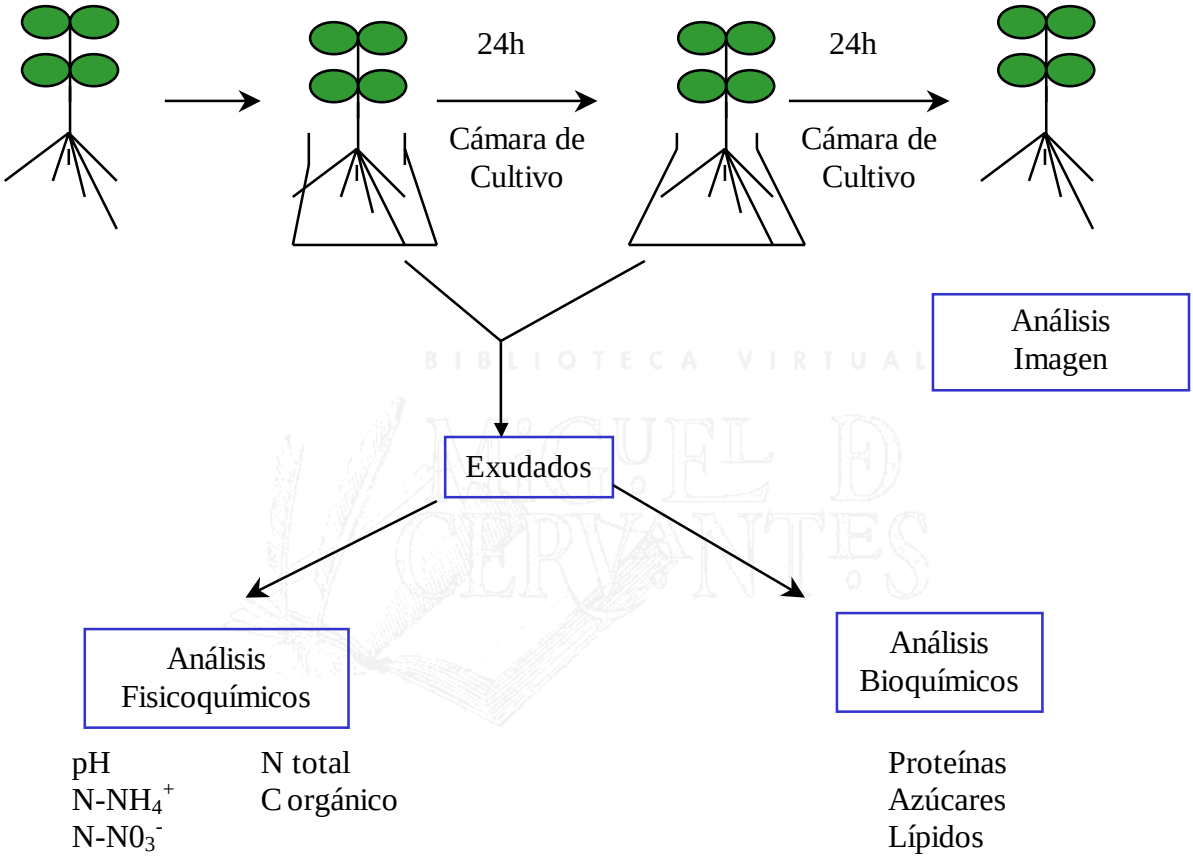


Figura 2.4. Protocolo de obtención y caracterización de exudados

Se pusieron las raíces de plantas limpias de suelo en matraces Erlenmeyer de 25 ó 100 mL, dependiendo del tamaño de la planta, que contenían 60 ó 100 mL de agua destilada, respectivamente. Se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas (16/8 h luz/oscuridad y 22 ºC/18 ºC, 70 % HR) durante 24 h, y en ese momento se pasaron a matraces Erlenmeyer con agua destilada estéril fresca y se mantuvieron otras 24 h. Se unieron los exudados recogidos, se filtraron al vacío por filtros millipore de 0.4µm, se repartieron en alícuotas y se congelaron a –20 ºC para su posterior análisis.

2.3.2.2. Caracterización de los exudados

Los exudados se sometieron a análisis fisicoquímicos y bioquímicos. A continuación

pasamos a describir la metodología empleada en cada caso.

2.3.2.2.1. Análisis fisicoquímicos

Los exudados se sometieron a los siguientes análisis: pH, nitrógeno amonio, nitrógeno nitrato, nitrogeno total y carbono orgánico.

2.3.2.2.1.a. Medida del pH

Se realizó sobre el volumen total de exudados filtrados antes de congelar. Se midió según se describe en 2.3.1.a.

2.3.2.2.1.b. Determinación de nitrógeno amonio

Se valoró el ión amonio en 5 mL de exudados siguiendo el método de Berthelot, modificado por Weatherburn (Weatherburn, 1967; Vollbrecht *et al.*, 1989; Hecht y Mohr, 1990), según se describe en 2.3.1.b.

2.3.2.2.1.c. Determinación de nitrógeno nitrato

Se determinó la concentración de nitrógeno nitrato en 1.5 mL según se describe en 2.3.1.c.

2.3.2.2.1.d. Determinación de nitrógeno total

Se determinó según se ha descrito en 2.3.1.d. para los suelos, modificando la cantidad de material de partida, 1 mL de exudados, en lugar de 2 g de suelo, y añadiendo 15 mL de SO_4H_2.

2.3.2.2.1.e. Determinación de carbono orgánico

Se empleó el método de Walkley y Black (1943) modificado. Dicho método se basa en la oxidación del material fácilmente oxidable con dicromáto potásico. La muestra de exudados se trató con un exceso de oxidante y la proporción gastada de éste se determinó valorando por retroceso con una solución de sulfato ferroso.

A 1 mL de exudados se le añadieron 15 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y 20 mL de H_2SO_4 concentrado, agitando la mezcla 1 min y dejándola reposar media hora. A continuación, se diluyó con 200 mL de agua destilada, con objeto de facilitar la observación del punto final de la titulación. Se añadieron 25 mL de H_3PO_4 al 50% (v/v) para hacer más patente el viraje y 10 gotas de difenilamina sulfúrica (10 g de $NH(C_6H_5)_2$, 1000 mL de H_2SO_4 y 200 mL de agua destilada) como indicador. Se valoró con $FeSO_4$ 0.5 N por retroceso. Simultáneamente se preparó un control con agua, para valorar los productos oxidantes de los reactivos.

Para calcular el procentaje de carbono orgánico de las muestras, se consideró que 1 mL de $K_2Cr_2O_7$ es equivalente a 0.003 g de carbono y que el método es efectivo en un 75 %, por lo cual el factor de corrección al 100 % es de 1.33 (García Trejo, 1981)

2.3.2.2.2. Análisis bioquímicos

La caracterización bioquímica de exudados se centró en los principios inmediatos: azúcares, proteínas y lípidos. A continuación pasamos a describir la metodología empleada en cada caso.

2.3.2.2.2.a. Determinación de azúcares

Para la determinación de azúcares utilizamos el método de la antrona (Loewus, 1952).

Se tomaron 1.5 mL de exudados y se añadió 3 mL de una solución recién preparada de antrona al 0,2 % en ácido sulfúrico concentrado (12N). Se mantienen al baño maría durante 10 min. Es estas condiciones, el ácido sulfúrico reacciona con los azúcares rindiendo 5-hidroxi-metil furfural, que con la antrona rinde una coloración verde, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glúcidos. Se deja enfriar y se mide la absorbancia a 540 nm, que determina el contenido de glúcidos solubles en etanol.

Los datos obtenidos se interpolaron en una recta patrón de glucosa (10–100 μg/mL) y los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.2.2.2.b. Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron según el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Se tomó 1 mL de exudados y se añadieron 5 mL de la solución A + B (50:1, v/v) (Apéndice A). Tras 15 min a temperatura ambiente, se añaden 0.5 mL del reactivo de Folin 1/3 y a los 30 min se mide la absorbancia a 500 nm. Cuando las muestras están poco concentradas, se lee la absorbancia a 740 nm.

Se construyó una curva de calibrado con 10 concentraciones de ovoalbúmina (0-0,9 mg/mL) y los valores se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

2.3.2.2.2.c. Determinación de lípidos

El análisis cualitativo de lípidos se llevó a cabo siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959). A 4 mL de exudados se le añadieron 2 mL de cloroformo y 5 mL de metanol (disolventes grado HPLC), agitándose la mezcla durante 2 min. Se añadieron otros 3 mL de cloroformo y tras agitar 2 min, se centrifugó durante 5 min a 1800*xg* y se repitió la extracción en la fase acuosa. Se mezclaron las fases orgánicas, tratándolas con $NaSO_4$ para eliminar el agua y se pasaron a un tubo B-29 de peso conocido, donde se evaporó a sequedad. El porcentaje de lípidos se obtiene por la diferencia de peso.

El residuo seco se resuspendió en 200 µL de cloroformo y se desarrolló una cromatografía en capa fina, con fase estacionaria de sílice, Orbisil 60-20 de 20 x 20 cm (Orbital Europa S.A.), junto a 4 patrones: colesterol, lecitina, ácido palmítico y tripalmitato al 10 % en cloroformo. La cromatografía se desarrolló en cubeta de vidrio, usando como fase móvil hexano:éter dietílico:ácido acético (70:30:1, v/v/v). Se reveló en otra cubeta de vidrio con atmósfera saturada de cristales de yodo.

2.3.3. Tratamiento de la información

El tratamiento de los datos obtenidos en esta parte del experimento se describe a continuación.

2.3.3.1. Tratamiento de los resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVAs) bidireccional con réplicas y dos factores de variación, tiempo de muestreo y tratamiento (bacteria inoculada y control). Con el fin de evaluar la influencia global del tratamiento, se realizó la media de los cuatro tiempos de muestreo para cada parámetro. Cuando la variable tratamiento influyó significativamente al nivel del 95 % según el ANOVA, se procedió a la comparación de la media mediante el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

2.3.3.2. Tratamiento de los resultados de la caracterización de los exudados

Los resultados obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional con réplicas y dos factores de variación, tiempo de muestreo y tratamiento (bacteria inoculada y control). Con el fin de evaluar la influencia global del tratamiento, se realizó la media de los cuatro tiempos de muestreo para cada parámetro. Cuando la variable tratamiento influyó significativamente al nivel del 95 % según el ANOVA, se procedió a la comparación de las medias por el test estadístico LSD (Sokal y Rohlf, 1979)

2.4. Materiales y métodos empleados en la caracterización de giberelinas producidas por las cepas de *B. pumilus* y *B. licheniformis*

Los resultados obtenidos en los trabajos previos a este estudio indicaron que además de los compuestos de naturaleza auxinoide mencionados en la introducción de este apartado, podían existir otros compuestos que, de alguna forma alteraban considerablemente no sólo el desarrollo del sistema radical, sino también el de la parte aérea, y por tanto, alteraban la actividad fisiológica general de la planta (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996). Como principal responsable de este efecto se emprendió el estudio de la producción de giberelinas.

Las giberelinas son reguladores del crecimiento vegetal, y entre los muchos efectos que provocan se encuentra la elongación de los entrenudos caulinares. El ensayo biológico característico de este tipo de reguladores es el de reversión de la enanización, aplicando una solución de giberelinas exógenas en el ápice caulinar de plantas enanas. Una vez realizada la prueba biológica, se procede a cuantificar y caracterizar las giberelinas presentes en el medio de cultivo bacteriano utilizado para revertir la enanización.

2.4.1. Pruebas biológicas

En primer lugar se enanizaron plántulas de aliso sanas con un inhibidor de la síntesis de giberelinas a nivel de la síntesis del ent-kaureno, paclobutrazol (PCB) (Rademacher, 1991). Se prepararon las plántulas como se describe en 2.1.3. Para enanizar las plantas, uno de los riegos se hizo con una solución de 100 ppm de PCB, transplantando todas las plántulas a los 15 y 30 días a vermiculita nueva. Se regaron con agua destilada y solución de Hoagland alternativamente, mientras que se mantuvieron en vermiculita.

A los 2 meses en los que se confirmó la enanización de las plantas tratadas frente a plantas control, se transplantaron a suelo de la aliseda (caracterizado en 2.3.1.) y se aplicaron microgotas del medio de cultivo de *B. pumilus*, *B. licheniformis* y GA_3, en el ápice caulinar de las plantas enanas (3 plantas por concentración ensayada en cada tratamiento), dejando un lote de plantas enanas como control. Se repitió la dosis a las 24 h.

Los medios de cultivo aplicados sobre el ápice caulinar de las plantas enanas se concentraron previamente 10, 20, 40 y 80 veces, según el siguiente protocolo. Se inocularon 5 matraces Erlenmeyer con 200 mL de caldo nutritivo con cada bacteria y se incubaron durante 24 h a 28 ºC en agitación a 400 rpm en un agitador orbital con campana UNIHOOD 500. Se centrifugaron a 5000*xg* durante 20 min y se eliminaron las células en suspensión restantes por filtración (Millipore 0.2 µm de diámetro). Se llevó a pH 2,5 con HCl 6N, y se hizo una doble extracción (1:1, v/v) con acetato de etilo evaporando a sequedad en rotavapor. Se resuspendió en 20, 10, 5 y 2.5 mL de acetato de etilo para concentrarlo 10, 20, 40 y 80 veces respectivamente y se extrajo (1:1, v/v) con tampón fosfato 0,1M (pH 8,5), añadiendo unas gotas

de Tween 20 (Sigma, St.Louis, MO) como mojante. Paralelamente, se prepararon las soluciones de GA_3 en tampón fosfato 0,1M (pH 8,5) en concentraciones de 5, 20 y 40 ppm y se aplicaron de la misma forma.

La dosis tanto de GA_3 como de medio de cultivo bacteriano se repitió 1 semana después de la primera aplicación. A las 2 semanas del comienzo del experimento (1ª aplicación), se prensaron las plantas y se realizó el análisis de imagen con un sistema Delta T-sistema DIAS II. Se midieron: longitud aérea, longitud radical, superficie aérea, superficie radical, longitud del brote, superficie aérea del brote y número de hojas del brote.

2.4.2. Tratamiento de la información

Se realizaron rectas de regresión (parámetros medidos frente a concentraciones) y las diferencias se analizaron por análisis de la varianza bidireccionales (ANOVAs); cuando las diferencias resultaron significativas ($p<0,05$) se realizó un LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.4.3. Caracterización de giberelinas por cromatografia de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis de giberelinas en los medios de cultivo por GC-MS requiere una exhaustiva preparación de la muestra, que se puede dividir en cuatro etapas: purificación, metilación, sililación e identificación. La cuantificación se realiza posteriormente.

Los análisis de GAs se realizaron en dos extracciones partiendo de distintos volúmenes, 10 mL para la cuantificación y 190 mL para la identificación de giberelinas en medio de cultivo de *Bacillus* sp., filtrado por 0.2 µm. Todos los análisis se repitieron al menos 2 veces. Se siguió el siguiente protocolo.

2.4.3.1. Purificación

Las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro. Se llevó la muestra a pH 2,5 y se realizó un reparto frente a acetato de etilo (3x, 1:1, (v/v)). La fracción orgánica resultante se repartió frente a agua a pH 2,5 (2x, 20:1, (v/v)), obteniéndose la fracción ácida de acetato de etilo donde se encuentran la mayoría de las GAs libres. Esta fracción se evaporó a sequedad.

A continuación se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en una columna de QAE-Sephadex A-25 (15 x 1 cm d.i.). El polvo de Sephadex se mezcló con acetato de sodio 1 M, se agitó y se dejó reposar la mezcla durante 15 min, descartando el acetato de sodio; esta operación se repitió 5 veces. Posteriormente, el polvo de Sephadex se almacenó en ácido acético 1N a 4 ºC. De esta solución se depositaron 15 mL en la columna, y ésta se equilibró con agua a pH 8,5 (Talón y Zeevaart, 1990).

El extracto seco se resuspendió en unas gotas de MeOH al 100 % y se añadieron 2 mL de agua a pH 8,5. La muestra se aplicó a la columna y se añadieron 15 ml de agua a pH 8,0. Posteriormente se eluyeron las GAs con 20 mL de ácido acético 1N. El volumen de ácido acético se redujo a 5 mL y la muestra se purificó mediante cartuchos Sep-Pak C_{18}.

El cartucho Sep-Pak se lavó mediante jeringuilla con 5 mL de MeOH (100 %) y posteriormente se pasaron 5 mL de agua a pH 2,5. A continuación se añadieron los 5 mL de muestra y se realizaron sucesivos lavados con 5 mL de ácido acético 1N y agua destilada. Las GAs se recuperaron en un eluato metanólico al 80 % (Talón *et al*, 1990) que se evaporó a sequedad.

Las muestras secas se resuspendieron en 2.5 mL de metanol al 20 % añadiendo 1 μg de ácido abscísico (ABA) como estándar de referencia del volumen de retención. Las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro y se separaron en un cromatógrafo Waters HPLC. Se utilizó una columna análitica Hypersil C_{18} (250 x 4,6 mm, 10 μm d.i.), unida a una precolumna también C_{18}. Se utilizó un gradiente lineal de 40 min del 20 al 100 % de MeOH, con agua acidulada con ácido acético al 1 %, a un flujo de 1 mL/min.

Los volúmenes de elución de las GAs se determinaron inyectando soluciones de GAs naturales (GA_8, GA_{29}, GA_{81}, GA_3, GA_1, GA_{20}, GA_{44}, GA_{19}, GA_7, GA_4, GA_9 y GA_{24}) y estudiando sus espectros de masas mediante GC-MS. El volumen de elución del ABA se determinó midiendo la absorbancia a 254 nm. De acuerdo con los análisis de las GAs estándares, se recogieron 40 fracciones, a intervalos de 1 min, descartándose las 10 primeras y las 2 últimas. El resto de fracciones se combinaron según los tiempos de retención y se evaporaron a sequedad.

2.4.3.2. Metilación

La metilación se llevó a cabo con diazometano, que se preparó como se describe a continuación. A un frasco destilador en donde se acoplaron un embudo y un frasco receptor, se añadieron 6 g de KOH en 10 mL de agua y 35 mL de carbitol. La temperatura se mantuvo a 80 ºC con un baño de agua en agitación. En el embudo se dispusieron 21,5 g de p-tolilsulfonil-nitrosamida en 125 mL de dietil éter, los cuales se añadieron gota a gota al frasco destilador. El producto final, diazometano, se recogió en el frasco receptor en baño de hielo. A ese frasco se le añadieron previamente 10 mL de dietiléter. Una vez acabada la reacción, el frasco con diazometano se envolvió con papel aluminio y se almacenó a –80ºC.

La metilación de las muestras se realizó resusupendiendo el residuo seco de cada fracción de HPLC en 200 μL de MeOH, sobre el cual se añadió inmediatamente un volumen en exceso de la disolución de diazometano en dietiléter. A los 20 min, se evaporó el éter mediante

ventilación en una campalna de extracción forzada, y luego el MeOH mediante un concentrador a vacío *Speed vaccuum*.

2.4.3.3. Sililación

Las muestras metiladas se resuspendieron 3 veces en 30 µL de MeOH (100 %) y se pasaron a insertos cónicos con capacidad de 200 µL. Las muestras se volvieron a secar a vacío y después se les añadió un volumen de 10 µL del reactivo de sililación, BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoracetamida). La reacción de sililación se dejó progresar al menos 1 h a temperatura ambiente antes de la inyección de la muestra.

2.4.3.4. Identificación de GAs

Las muestras se añalizaron mediante cromatografía de gases en combinación con espectrometría de masas (GS-MS) en modo *full scan*. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Star 3400 Varian). Las muestras (1µL) se co-inyectaron con una mezcla de alcanos (solución de parafilm en hexano) para la obtención de los tiempos relativos de retención (índices de retención de Kovats, KRIs) (Gaskin y McMillan, 1991). Las inyecciones se realizaron automáticamente con un inyector automático (8200 CX Varian) en modo *splitless* utilizando una columna capilar de sílica fundida (DB-5 MS, J&W Scientific) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d.i., a una temperatura de horno de 50 ºC. Después de 1 min, se inició una rampa de ascenso a 30 ºC/min hasta 240 ºC y posteriormente esta temperatura se incrementó hasta 280 ºC con una rampa de 10 ºC/ min. La presión del helio fue de 60 kPa. Las temperaturas del inyector, la interfase y la fuente iónica del espectrómetro de masas fueron 280, 290 y 170 ºC, respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV y el voltaje del multiplicador, el voltaje de amplitud de la modulación axial y la corriente emitida fueron de 1200 V, 4 V y 36 µA, respectivamente. Se utilizó el método de ionización por impacto electrónico (EI) y las condiciones de la GC-MS se testaron periódicamente con inyecciones de un estándar de GA_1 deuterada. Los espectros de masas se adquirieron mediante barridos desde 200 a 600 amu a una velocidad de 1 s por ciclo de barrido. La identificación de GAs se estableció comparando los espectros de masas, los KRIs y los volúmenes de elución en HPLC con los de los estándares naturales (Gaskin y McMillan, 1991).

2.4.4. Cuantificación de GAs

En el proceso de cuantificación de las GAs se utilizaron estándares internos marcados con deuterio. En base a estimas previas, se añadieron distintas concentraciones de estándares internos en extracciones consecutivas, repitiendo este paso hasta que se igualaron las concentraciones de los estándares y las giberelinas presentes en la muestra, requisito

indispensable para la cuantificación (Talón y Zeevaart, 1990). Una vez determinada la cantidad de estandar interno, se llevó a cabo la cuantificación definitiva. Las concentraciones de GA_3 presentes en los extractos se calcularon generando curvas de concentraciones conocidas de GA_3, considerando las pérdidas de GA_1 presentes en la misma fracción que la GA_3. Las estimas de 3-epiGA_1 e iso GA_3 se obtienen comparando las intensidades de los iones con los isómeros correspondientes (GA_1 y GA_3, respectivamente). Los enriquecimientos de dichos estándares se determinaron mediante GC-MS y éstos fueron: [17-$^2H_2$]GA_1, 99.6 %, [17-$^2H_2$]GA_4, 93.3 %, [17-$^2H_2$]GA_{20}, 99.6 %.

Para la cuantificación, se procesaron las muestras como se ha descrito anteriormente, añadiendo los estándares deuterados como estándares internos, inmediatamente antes de la evaporación del extracto metanólico, antes de fraccionar en el HPLC. Las fracciones se agruparon en función del tiempo de retención de las GAs para cuantificar. La metilación y derivatización de estas fracciones se efectuaron según se ha descrito anteriormente para la identificación. Las muestras se analizaron y cuantificaron por GC-MS en modo SIM (Selected Ion Monitoring). Se utilizó un espectrómetro de masas con un analizador tipo cuadrupolo (MD 800 Fisons), acoplado a un cromatógrafo de gases (Fisons GC 8000 series) equipado con una columna similar a la utilizada en la identificación de GAs. Un volumen de 1 a 2 μL de cada muestra se inyectó manualmente en modo *splitless* y el programa de temperatura del horno fue el mismo utilizado para la identificación. La presión del helio fue 85 kPa y las temperaturas del inyector, la interfase y la fuente del MS fueron 250, 250 y 200 ºC, respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV y el tiempo de búsqueda de cada ion fue de 80 ms. Las parejas de iones detectados para los metiltrimetilsilil (MeTMSi) derivados de las GAs fueron los siguientes: (MeTMSi)-GA_1/[$^2H_2$]GA_1 , m/z 506 y 508, (MeTMSi)-GA_4/[$^2H_2$]GA_4 , 284 y 286 m/z , (MeTMSi)-GA_{20}/[$^2H_2$]GA_{20} , 418 y 420 m/z. En cada muestra, la identidad de la mezcla de GAs endógenas y estándares del análisis SIM se comprobó previamente mediante análisis de *full scan* con el cromatógrafo utilizado en las determinaciones cualitativas descrito anteriormente.

Determinación de las cantidades de GAs. Se calculó la relación entre las áreas de los picos de los iones no marcados (T) y las de los marcados (M) en las GAs naturales (Gaskin y MacMillan, 1991). Los porcentajes de pureza de las GAs marcadas se utilizaron para conocer la relación entre el ion marcado (B) y el ion no marcado (A) en los estándares de GAs. La cuantificación se efectuó mediante la fórmula

$$Q= S (BX – AY)/ (TY – MX)$$

En donde

S: cantidad de GA marcada añadida al extracto metanólico

X: % de area del pico de GA no marcada en el medio de cultivo bacteriano

Y: % del área del pico de GA marcada en el medio de cultivo bacteriano

BIBLIOTECA VIRTUAL

3. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn Y *Pinus pinea* CON *B.pumilus* Y *B.licheniformis*

3.1. Resultados obtenidos en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn con *B.pumilus* y *B.licheniformis* en condiciones de laboratorio

3.1.1. Monitorización de las inoculaciones mediante análisis del perfil de fosfolípidos de membrana (PLFAs)

Después de extraer, fraccionar, metilar las muestras e incorporarles una cantidad conocida del ácido graso metilado Me-C19 como patrón interno, se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Tras identificar el pico que correspondía al patrón interno, se adjudicaban los demás picos a los ácidos grasos correspondientes según el protocolo de Fostergard *et al.*, (1991). Se integraban las áreas correspondientes y se referían al Me-C19, obteniendo el porcentaje de área de cada ácido graso. Los datos se normalizaban tomando el log (% área +1).

Estos datos, que corresponden a los PLFAs totales, se organizaron en ocho matrices que corresponden al siguiente diseño factorial: (2) análisis del perfil de ácidos grasos de las bacterias rizosféricas que crecían en placa (PLFAs de placa), y directamente del suelo rizosférico a partir del cual se prepararon las suspensiones diluciones para el análisis de placa (PLFAs de suelo), (2) en dos suelos de características distintas (aliseda -suelo A- y parcelas-suelo B), y por (2) dos tratamientos (*B.pumilus* o *B.licheniformis)*. Cada matriz se compone de 28 filas x 8 columnas, las 28 filas corresponden a los ácidos grasos analizados y las 8 columnas al control y cada tratamiento (*B.pumilus* o *B.licheniformis*), en los cuatro tiempos de muestreo (T0: 24 h después de la inoculación, T1: 2 semanas, T2: 6 semanas y T3: 8 semanas después de la inoculación); cada dato es la media de tres réplicas. El análisis de PLFAs de placa nos proporciona información sobre las poblaciones bacterianas rizosféricas viables y cultivables, mientras que el análisis directo de suelo rizosférico nos proporciona información sobre microorganismos totales (cultivables y no cultivables, viables y no viables).

3.1.1.1. Resultados de la ordenación mediante ACP de los perfiles de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa* en los suelos A y B, inoculados con *B.pumilus* o *B.licheniformis*

Los resultados del perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa*, extraídos de placa y directamente de suelo rizosférico, para cada tipo de suelo y tratamiento aparecen expuestos en las Tablas I a VIII del Apéndice 1. Estos datos se procesaron conjuntamente (suelo A y B) para cada tratamiento y origen de PLFAs (de placa o suelo rizosférico) y sus controles, y los resultados aparecen a continuación en las Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4.

3.1.1.1.a. Inoculación de *A.glutinosa* con *B.pumilus*

En el caso del ACP realizado con los datos de PLFAs extraídos directamente de suelo rizosférico procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B (Tablas I y V, Apéndice 1) (Figura 3.1). Las muestras se ordenan en el plano definido por dos ejes que absorben el 78 % de la varianza (Tabla 3.I). La ordenación se define en función del suelo donde crecieron las plantas, de tal forma que tanto los controles como las plántulas inoculadas con *B .pumilus* en suelo A, aparecen agrupados hacia los valores más positivos de los ejes I y II. Las muestras de suelo B aunque aparecen más dispersas, se separan de las anteriores fundamentalmente hacia valores negativos del eje II y a lo largo del eje I

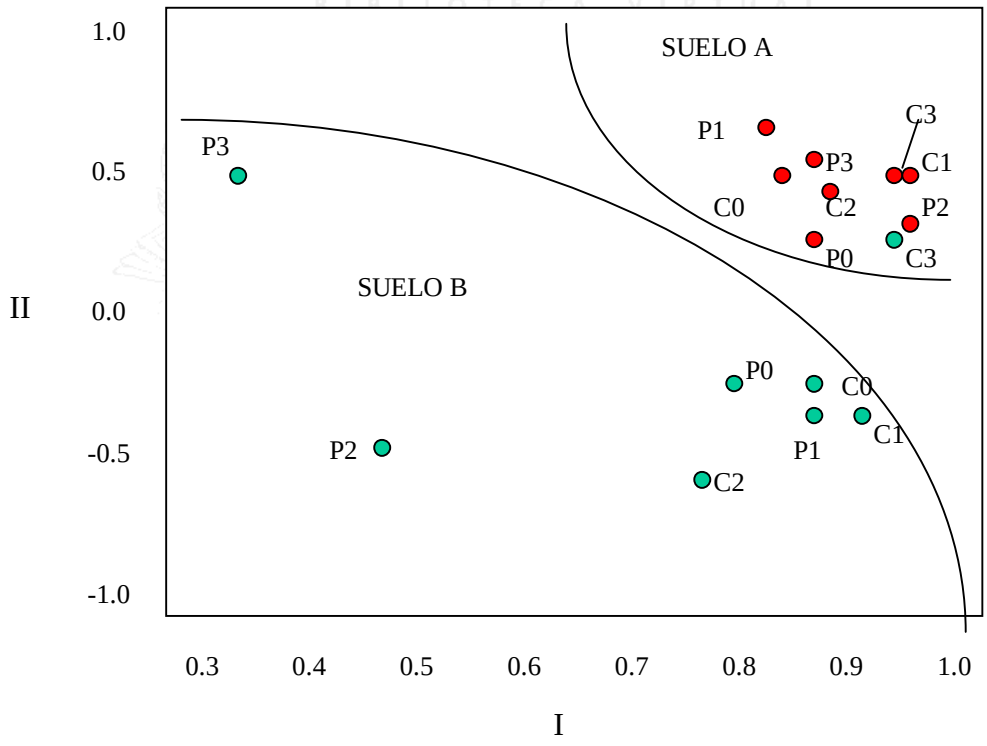


Figura 3.1. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.pumilus* (P) y no inoculados (control-C) , de suelos A (rojo) y B (azul), en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2, 3). (PLFAs de suelo)

Tabla 3.I. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	68,05	68,05
EJE II	9,95	78,00

Los factores de carga que definen esta separación aparecen en la Tabla 3.II.

Tabla 3.II. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,734	-0,186
2	br16:0	0,584	-0,252
3	i16:0	0	0
4	16:1ω9	0,194	-0,914
5	16:1ω7c	0	0
6	16:1ω7t	0,796	0,382
7	16:1ω5	0,542	-0,373
8	16:0	0,385	-0,807
9	br17:0	0,824	0,156
10	Me16	0	0
11	i17	0,697	0,290
12	a17	0,416	-0,675
13	17:1ω8	0,913	0,192
14	cy17	0,917	0,099
15	17:0	0,499	0,664
16	br18:0	0,808	0,061
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	-0,158	-0,034
19	18:1ω9	0,695	0,156
20	18:1ω7	0,772	0,233
21	18:1	0,940	0,287
22	18:0	0,070	0,322
23	19:1a	0,838	-0,304
24	Me18	0,569	-0,134
25	19:1b	0,789	0,413
26	Cy19	0,893	0,275
27	20:4	0,245	-0,863
28	20:5	0	0
29	20:0	0,496	-0,647
30	i16:1	0,496	-0,647

En la Figura 3.2, aparece la representación del ACP realizado con los resultados de los PLFAs extraídos de cepas bacterianas cultivables en placa, procedentes de la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B (Tablas II y VI, Apéndice 1, respectivamente). En este caso, las muestras se agrupan por tiempos de muestreo, independientemente del suelo donde crecieron las plantas. Los 2 primeros ejes que absorben el 83.85 % de la varianza (Tabla 3.III), definen un plano en el que se organizan cuatro grupos, de los cuales, los que corresponden a T1 y T2, aparecen próximos y hacia los valores más altos de los componentes principales, separándose de T0 y de T3, que se sitúan hacia los valores más bajos del eje I y más altos del eje II, respectivamente.

Los factores de carga que definen esta separación aparecen en la Tabla 3.IV.

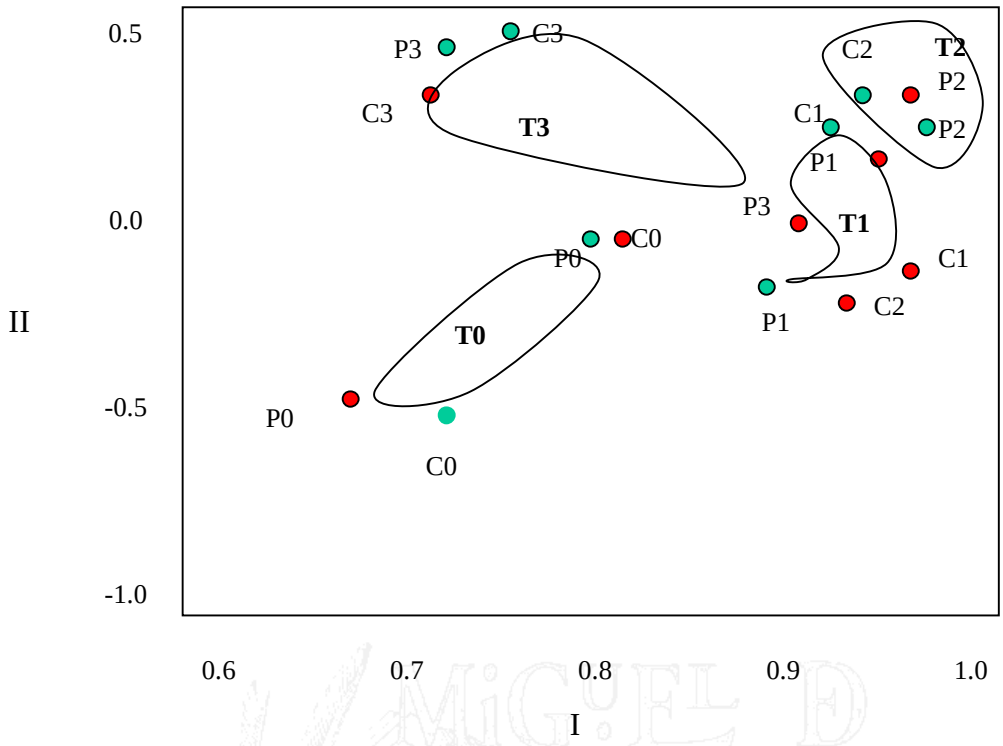


Figura 3.2. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.pumilus* (P) y sus controles (C) en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2, 3), en los suelos A (rojo) y B (azul). (PLFAs de placa)

Tabla 3.III. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	76,14	76,14
EJE II	7,71	83,85

Tabla 3.IV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,662	0,511
2	br16:0	0,323	0,203
3	i16:0	0,312	0,157
4	16:1ω9	0,908	-0,101
5	16:1ω7c	0,081	0,553
6	16:1ω7t	0,636	-0,488
7	16:1ω5	-0,150	0,687
8	16:0	0,636	-0,216
9	br17:0	-0,718	-0,039
10	Me16	0,853	-0,005
11	i17	0,867	0,314
12	a17	0,773	0,251
13	17:1ω8	0,225	0,667
14	cy17	0,389	0,830
15	17:0	0,255	0,806
16	br18:0	-0,295	0,670
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	-0,235	0,677
19	18:1ω9	0,059	0,061
20	18:1ω7	-0,646	0,171
21	18:1	0,071	-0,276
22	18:0	0,782	-0,161
23	19:1a	-0,451	0,489
24	Me18	0,584	-0,543
25	19:1b	0,406	0,250
26	Cy19	0	0
27	20:4	-0,050	0,447
28	20:5	0,133	0,337

3.1.1.1.b. Inoculación de *A.glutinosa* con *B.licheniformis*

En la Figura 3.3 se representa el ACP correspondiente a los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo rizosférico, de plántulas crecidas en los suelos A y B, inoculados con *B.licheniformis* y sus controles (Tablas III y VII, Apéndice 1). Al igual que ocurría en la ordenación de PLFAs de suelos inoculados con *B.pumilus* (Figura 3.2), las muestras se agrupan según su origen, las de suelo A aparecen hacia los valores más negativos del eje II, y las de suelo B aparecen hacia los valores más positivos de este mismo eje, ambas distribuidas a lo largo del eje I.

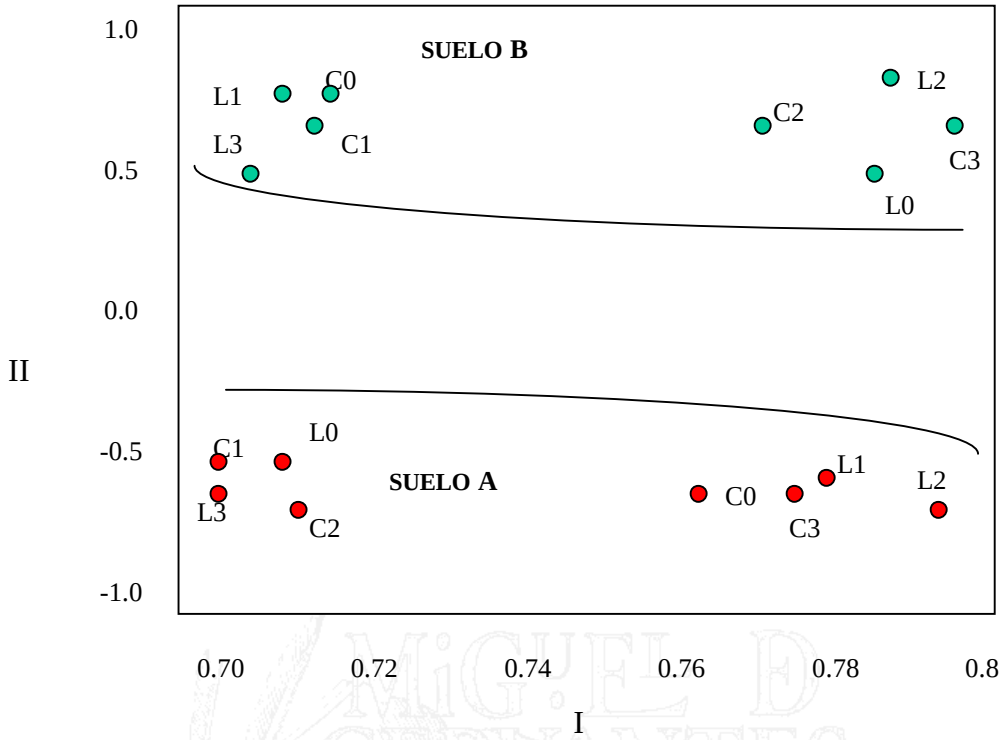


Figura 3.3. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo rizosférico procedente de plántulas inoculadas con *B.licheniformis* (L) y sus controles (C), en los suelos A (rojo) y B (azul), en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2, 3). (PLFAs de suelo)

Los dos ejes absorben un 61,82 % de la varianza (Tabla 3.V) y los factores de carga que disponen esta separación aparecen en la Tabla 3.VI.

Tabla 3.V. Porcentaje de la varianza absorbida por los dos ejes principales

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	56,49	56,49
EJE II	5,33	61,82

Tabla 3.VI. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,878	-0,186
2	br16:0	0,948	0,144
3	i16:0	0	0
4	16:1ω9	0	0
5	16:1ω7c	-0,460	0,002
6	16:1ω7t	0,949	0,102
7	16:1ω5	0,393	-0,415
8	16:0	0	0
9	br17:0	0,794	0,279
10	Me16	0	0
11	i17	0,852	-0,342
12	a17	0,614	-0,242
13	17:1ω8	0,990	0,018
14	cy17	0,987	0,008
15	17:0	0,636	0,719
16	br18:0	0,842	-0,423
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	0,915	-0,301
19	18:1ω9	0,962	0,047
20	18:1ω7	0,868	0,013
21	18:1	0,967	0,088
22	18:0	-0,338	0,042
23	19:1a	0,741	-0,284
24	Me18	0,959	0,094
25	19:1b	0,918	0,315
26	Cy19	0,962	-0,030
27	20:4	0,769	-0,464

La Figura 3.4 muestra el ACP realizado con los datos de PLFAs extraídos de cepas bacterianas cultivables en placa, procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.licheniformis* y de sus controles, crecidas en los suelos A y B (Tablas IV y VIII). Las muestras inoculadas procedentes de ambos suelos se agrupan, y se sitúan hacia los valores más positivos de los ejes I y II, que absorben el 74,14 % de la varianza (Tabla 3.VII). A pesar de que las muestras inoculadas se agrupan en la misma zona del plano definido por los componentes principales, dentro de la nube de puntos que forman, se ordenan según el suelo de origen. En cuanto a los controles, cabe destacar que se aprecia una dispersión de los mismos en función del tiempo de muestreo, tanto en el caso de los suelos procedentes de la aliseda como de las parcelas, reflejo de la distinta composición de microorganismos cultivables y viables. Al final del experimento, tanto los suelos procedentes de la aliseda como los procedentes de las parcelas tienden a aproximarse a sus equivalentes inoculados

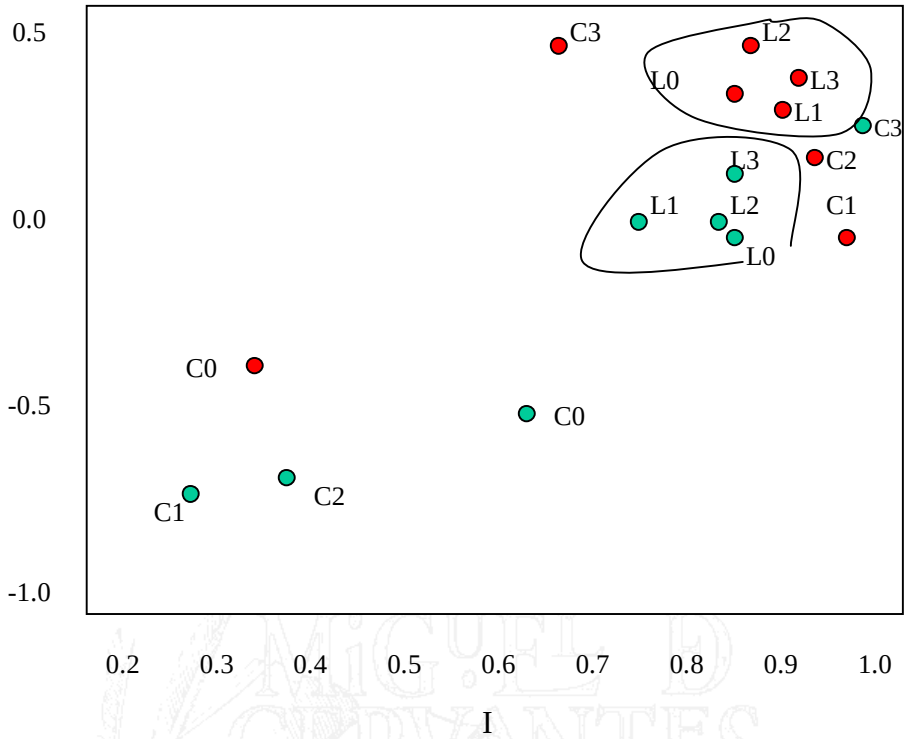


Figura 3.4. Representación del ACP correspondiente a los datos de PLFAs extraídos de cepas bacterianas cultivables procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.licheniformis* (L) y sus controles (C), en los suelos A (rojo) y B (azul), en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2, 3). (PLFAs de placa)

Tabla 3.VII. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	61,05	61,05
EJE II	13,09	74,14

Los factores de carga que definen esta separación en los dos ejes principales aparecen en la Tabla 3.VIII.

Tabla 3.VIII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,884	0,202
2	br16:0	0,873	0,191
3	i16:0	0,932	-0,174
4	16:1ω9	0,899	-0,248
5	16:1ω7c	-0,176	0,717
6	16:1ω7t	0,681	0,024
7	16:1ω5	0,283	-0,223
8	16:0	0,745	,395
9	br17:0	0,728	-0,176
10	Me16	0,599	-0,438
11	i17	0,829	-0,136
12	a17	0,729	-0,099
13	17:1ω8	0,938	0,043
14	cy17	0,868	0,408
15	17:0	0,172	0,604
16	br18:0	-0,015	0,267
17	Me17	0,367	-0,122
18	18:2ω6	-0,559	0,152
19	18:1ω9	0,333	-0,220
20	18:1ω7	0,491	0,320
21	18:1	0,199	0,873
22	18:0	-0,271	0,271
23	19:1a	0,274	0,208
24	Me18	0,706	-0,306
25	19:1b	0	0
26	Cy19	-0,068	-0,114
27	20:4	0,108	0,883

3.1.1.2. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa*, inoculada con *B.pumilus* o *B.licheniformis*, en el suelo A

3.1.1.2.a. Inoculación de *A.glutinosa* con *B.pumilus*

El ACP correspondiente a los ácidos grasos totales extraídos de suelo rizosférico (PLFAs de suelo) inoculado con *B.pumilus* y de su control en el suelo A (Tabla I, Apéndice 1) aparece en la Figura 3.5.

La ordenación de las muestras nos permite detectar como a las 24 h de inocular (T0) el suelo control (C0) se separa del suelo inoculado con *B.pumilus* (BP0). La muestra de *B.pumilus* a tiempo inicial (BP0) se sitúa hacia los valores más bajos de los ejes I y II, separándose de las demás. Posteriormente se aprecia una agrupación de las muestras inoculadas y de los controles, aún siendo acusada la distancia entre el suelo inoculado y el control a tiempo 1.

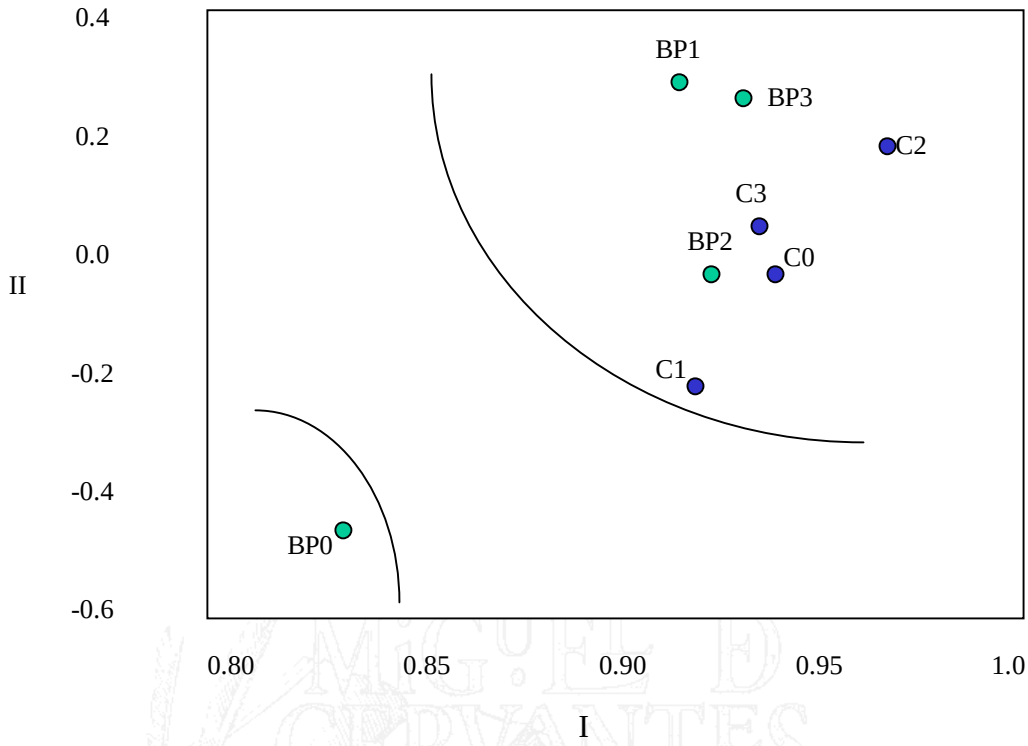


Figura 3.5. Representación del ACP efectuado con los resultados de los análisis de PLFAs extraídos de suelo rizosférico procedente de plántulas inoculadas con *B.pumilus* (BP) y sus controles (C), en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2 , 3) (PLFAs de suelo)

La varianza absorbida por los dos primeros ejes fue del 90.14 % (Tabla 3.IX). Los factores de carga que determinan la separación aparecen en la Tabla 3.X

Tabla 3.IX. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	85,4	85,4
EJE II	4,74	90,14

Tabla 3.X. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,336	-0,001
2	br16:0	0,382	-0,295
3	i16:1	0,829	-0,405
4	16:1ω9	0	0
5	16:1ω7c	0,829	-0,405
6	16:1ω7t	0	0
7	16:1ω5	-0,308	0,566
8	16:0	0,675	-0,395
9	br17:0	0,829	-0,405
10	Me16	0,171	-0,798
11	i17	0	0
12	a17	0,063	0,631
13	17:1ω8	0,850	0,261
14	cy17	0,856	0,340
15	17:0	0,877	0,274
16	br18:0	-0,772	0,141
17	Me17	0,894	0,142
18	18:2ω6	0	0
19	18:1ω9	0,155	0,213
20	18:1ω7	0,214	0,802
21	18:1	0,344	0,561
22	18:0	0,532	0,639
23	19:1a	0,029	0,413
24	Me18	0,934	-0,168
25	19:1b	0,569	-0,127
26	Cy19	0,491	0,543
27	20:4	0,654	0,615
28	20:0	0,844	

El ACP (Figura 3.6) realizado con las muestras de placa, (Tabla II, Apéndice 1), confirma los resultados obtenidos con las muestras de suelo, al separarse claramente las muestras control y las inoculadas con *B. pumilus* en T0 (BP0). En este caso detectamos una evolución de las muestras inoculadas semejante a la observada al realizar el análisis de PLFAs de suelo. Sin embargo, los controles presentan una ordenación distinta en este análisis de bacterias cultivables y viables. La muestra C3 se desplaza hacia los valores más bajos de los ejes I y II, y C0 hacia valores intermedios, agrupándose las demás muestras hacia los valores más positivos del eje I y más negativos del eje II.

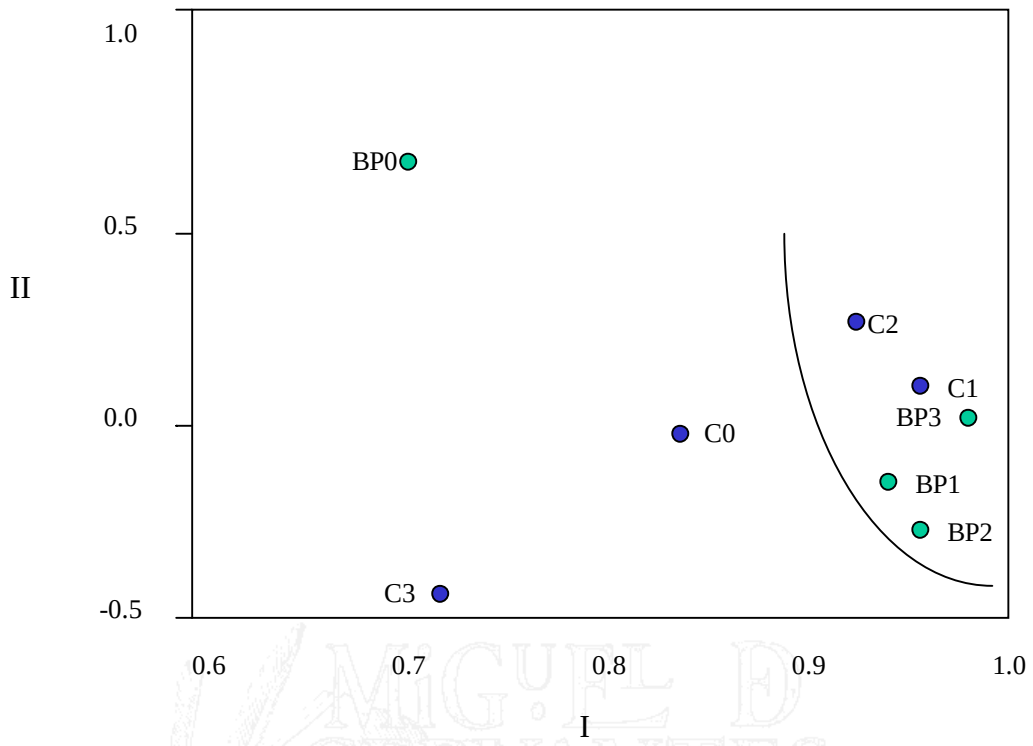


Figura 3.6. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.pumilus* (BP) y sus controles (C), en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2 , 3) (PLFAs de placa)

El porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes es del 86,9 % (Tabla 3.XI). Los factores de carga de cada variable aparecen en la Tabla 3.XII

Tabla 3.XI. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	78,12	78,12
EJE II	8,78	86,90

Tabla 3.XII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,790	0,088
2	br16:0	0,347	0,019
3	i16:0	0,089	-0,504
4	16:1ω9	0,321	0,659
5	16:1ω7c	0,752	-0,117
6	16:1ω7t	0,145	0,748
7	16:1ω5	0,066	-0,721
8	16:0	0,531	0,587
9	br17:0	-0,415	0,135
10	Me16	0,155	0,669
11	i17	0,530	0,120
12	a17	0,598	0,663
13	17:1ω8	0,927	-0,056
14	cy17	0,907	-0,258
15	17:0	0,438	-0,859
16	br18:0	0,097	-0,874
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	0,752	-0,117
19	18:1ω9	-0,085	0,198
20	18:1ω7	0,470	0,290
21	18:1	0,536	0,499
22	18:0	-0,655	0,096
23	19:1a	0,450	-0,710
24	Me18	-0,465	0,310
25	19:1b	-0,030	-0,895
26	Cy19	0	0
27	20:4	0,752	-0,117

3.1.1.2.b. Inoculación de *A.glutinosa* con *B.licheniformis*

El ACP correspondiente a los resultados obtenidos en el análisis de ácidos grasos totales extraídos de suelo rizosférico (PLFAs de suelo) de plántulas inoculadas con *B.licheniformis* y de su control en el suelo A (Tabla III, Apéndice 1) aparece en la Figura 3.7.

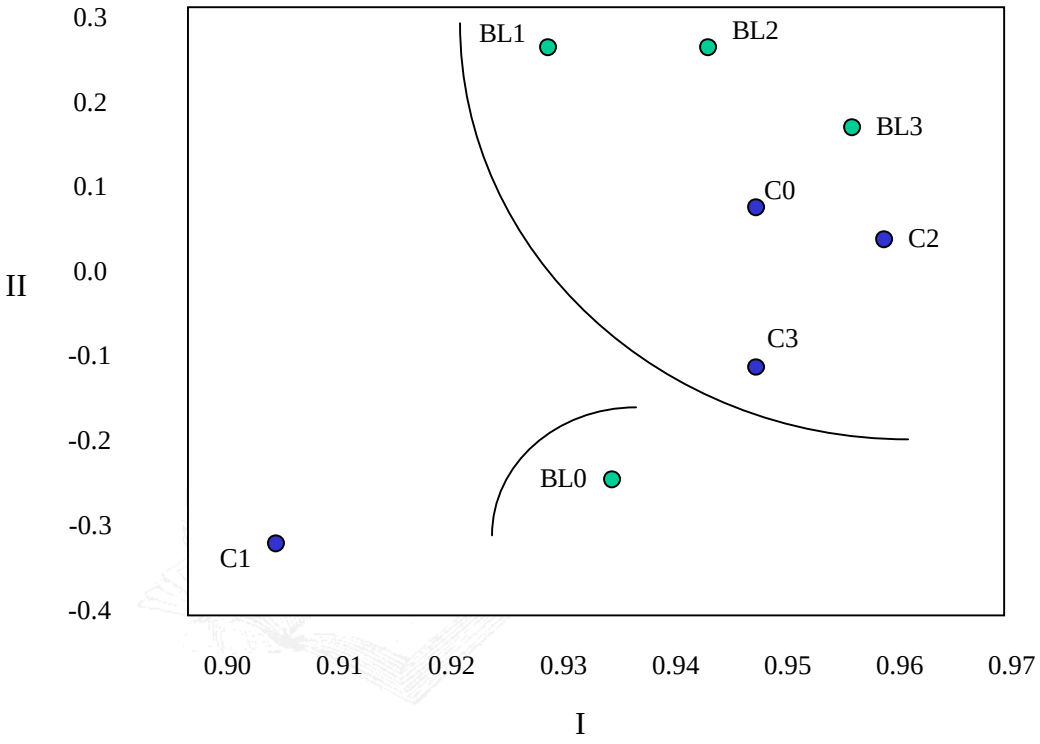


Figura 3.7. Representación del ACP efectuado con los resultados de los análisis de PLFAs extraídos de suelo rizosférico procedente de plántulas inoculadas con *B. licheniformis* (BL) y no inoculadas (control-C), en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2 , 3) (PLFAs de suelo)

En este ACP se observa como a las 24 h de inocular (T0) el control (C0) se separa del tratamiento (*B.licheniformis* BL0). Cabe destacar que la máxima separación entre las muestras inoculadas y el control se observa como en el caso anterior, a las 2 semanas de comenzar el experimento (T1); posteriormente las muestras se agrupan próximas a los controles

Los dos ejes principales absorben el 92,94 % de la varianza (Tabla 3.XIII). Los factores de carga que definen esta ordenación aparecen en la Tabla 3.XIV.

Tabla 3.XIII. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	88,85	88,85
EJE II	4,09	92,94

Tabla 3.XIV. Factores de carga de las variables en los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,366	-0,753
2	br16:0	-0,352	-0,505
3	i16:1	0	0
4	16:1ω9	0	0
5	16:1ω7c	0	0
6	16:1ω7t	0	0
7	16:1ω5	0,429	-0,009
8	16:0	0,256	-0,286
9	br17:0	0	0
10	Me16	-0,245	0,335
11	i17	0	0
12	a17	0,726	-0,087
13	17:1ω8	0,597	0,229
14	cy17	0,865	0,358
15	17:0	0,834	0,336
16	br18:0	-0,558	0,783
17	Me17	0,860	-0,316
18	18:2ω6	0	0
19	18:1ω9	0,645	-0,642
20	18:1ω7	0,412	0,053
21	18:1	0,395	0,127
22	18:0	0,432	0,598
23	19:1a	-0,222	0,449
24	Me18	0,804	0,196
25	19:1b	0,472	0,241
26	Cy19	-0,033	0,879
27	20:4	0,774	0,333
28	20:0	0,805	-0,017

El ACP realizado con los resultados de PLFAs extraídos de cepas bacterianas cultivables, (Tabla IV, Apéndice 1) indica una clara separación entre los suelos inoculados y los controles (Figura 3.8). De nuevo detectamos una separación de las muestras inoculadas con *B.licheniformis* a las 24 h y 2 semanas con respecto a las muestras BL2 y BL3, aunque estas diferencias son menos acusadas que en el caso de la ordenación realizada con los PLFAs de suelo. La dispersión de los controles con respecto a las muestras inoculadas, indica que la inoculación del suelo A amortigua las diferencias en la población de bacterias viables entre tiempos de muestreo.

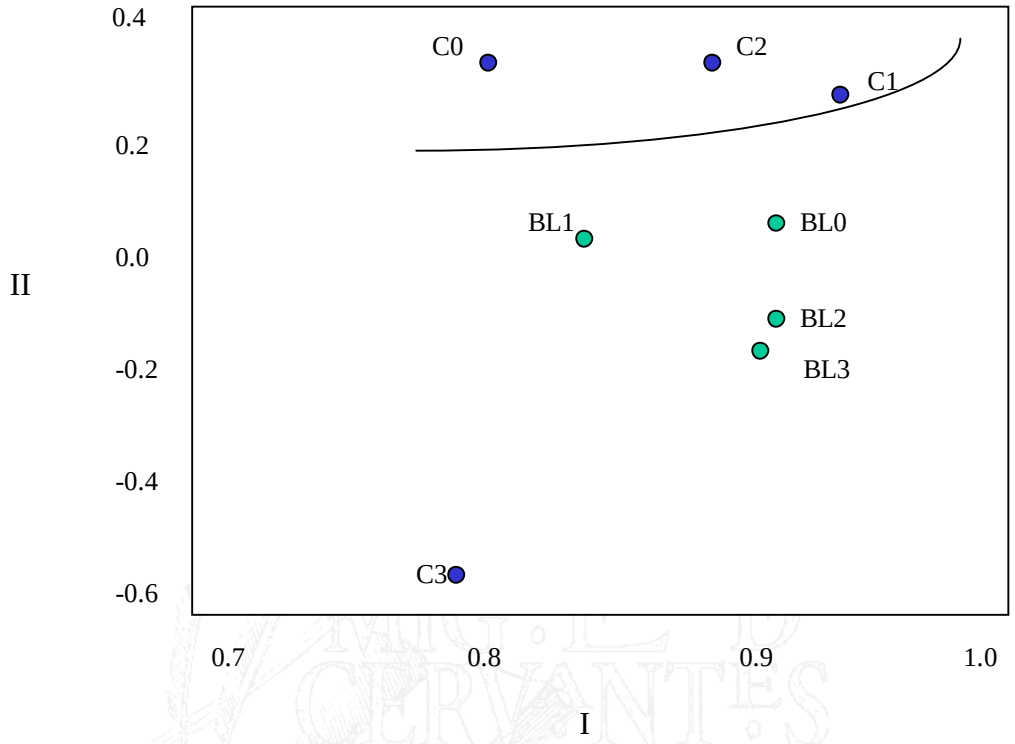


Figura 3.8. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.licheniformis* (BL) y no inoculadas (control-C), en el suelo A, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2, 3) (PLFAs de placa).

Los ejes I y II absorben 86,02 % de la varianza (Tabla 3.XV). Los factores de carga que determinan la ordenación aparecen en la Tabla 3.XVI.

Tabla 3.XV. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	78,73	78,73
EJE II	7,29	86,02

Tabla 3.XVI. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJEII
1	15:0	0,383	0,773
2	br16:0	0,023	0,615
3	i16:0	0,720	-0,226
4	16:1ω9	0,877	-0,134
5	16:1ω7c	-0,193	0,864
6	16:1ω7t	0,297	-0,330
7	16:1ω5	0,508	0,101
8	16:0	-0,484	0,775
9	br17:0	0,121	-0,059
10	Me16	0,938	-0,231
11	i17	0,945	0,026
12	a17	0,972	0,043
13	17:1ω8	0,917	0,274
14	cy17	0,366	0,903
15	17:0	0,570	0,500
16	br18:0	-0,294	-0,206
17	Me17	0,368	-0,023
18	18:2ω6	0,322	0,443
19	18:1ω9	0,132	-0,590
20	18:1ω7	-0,133	0,541
21	18:1	0,413	0,337
22	18:0	-0,312	0,469
23	19:1a	0,738	-0,007
24	Me18	0,379	-0,543
25	19:1b	0	0
26	Cy19	0	0
27	20:4	0,032	0,652

3.1.1.3. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *A.glutinosa*, inoculada con *B.pumilus* o *B.licheniformis*, en el suelo B

3.1.1.3.a. Inoculación de *A.glutinosa* con *B.pumilus*

En la Figura 3.9. aparece representado el ACP realizado con los resultados del análisis de ácidos grasos extraídos de suelo rizosférico (PLFAs de suelo), inoculado con *B.pumilus* y no inoculadas (control), en el suelo B (Tabla V, Apéndice 1).

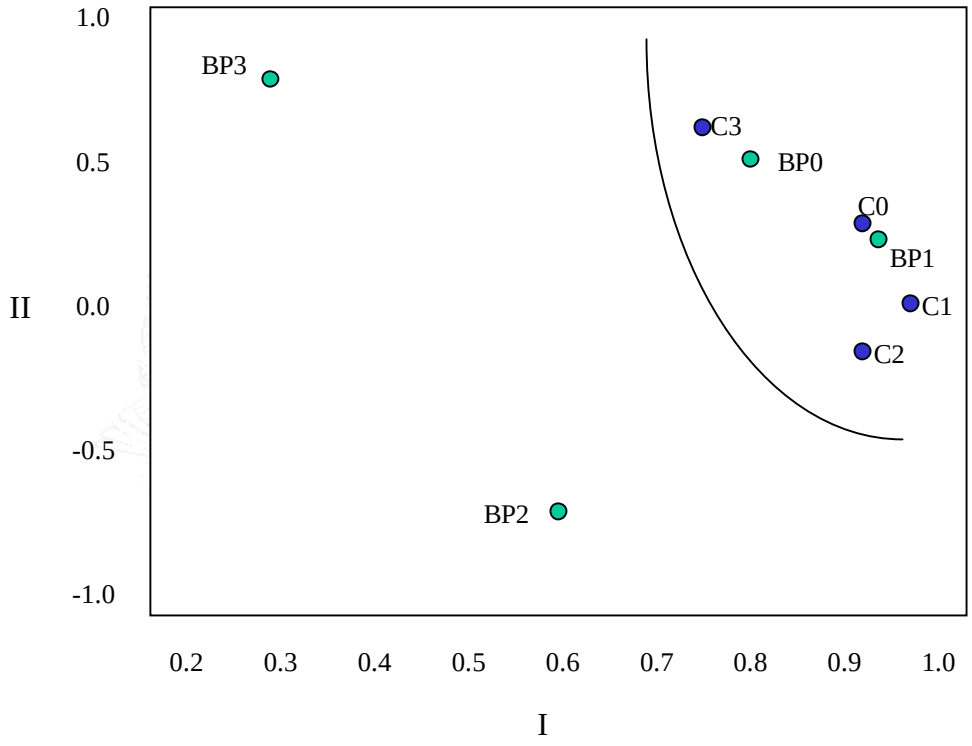


Figura 3.9. Representación del ACP efectuado con los resultados de los análisis de PLFAs extraídos de suelo rizosférico procedente de plántulas inoculadas con *B.pumilus* (BP) y sus controles (C), en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2 , 3) (PLFAs de suelo)

Todas las muestras se sitúan hacia los valores más positivos de los ejes I y II, excepto BP3, cuya posición se define por los valores más bajos del eje I y más positivos del eje II, y BP2, que se sitúa hacia los valores más negativos del eje II e intermedios del eje I. La proximidad de las muestras inoculadas y sus controles hasta las 2 semanas, indica que la incorporación de *B. pumilus* al suelo B no altera el perfil de ácidos grasos de estos suelos de forma acusada. Sin embargo, el efecto de la inoculación queda evidenciado por la clara divergencia de las muestras BP2 y BP3 con respecto a sus controles.

Los ejes I y II absorben el 79,42 % de la varianza (Tabla 3.XVII). Los factores de carga que definen la separación de las muestras aparecen en la Tabla 3.XVIII.

Tabla 3.XVII. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	63,53	63,53
EJE II	15,89	79,42

Tabla 3.XVIII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,933	0,286
2	br16:0	0,742	-0,170
3	i16:0	0	0
4	16:1ω9	0,785	-0,057
5	16:1ω7c	0	0
6	16:1ω7t	0,873	0,337
7	16:1ω5	0	0
8	16:0	0,553	0,142
9	br17:0	0,588	0,698
10	Me16	-0,469	0,779
11	i17	0,608	0,261
12	a17	0,944	0,062
13	17:1ω8	0,415	0,590
14	cy17	0,564	0,808
15	17:0	0	0
16	br18:0	-0,007	0,741
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	-0,211	-0,535
19	18:1ω9	0,539	-0,436
20	18:1ω7	0,411	-0,615
21	18:1	0,881	-0,129
22	18:0	-0,469	0,779
23	19:1a	0,910	-0,076
24	Me18	0,478	-0,786
25	19:1b	-0,230	0,880
26	Cy19	0,302	0,314
27	20:4	0,886	-0,024

La Figura 3.10, representa el ACP realizado con los resultados de ácidos grasos extraídos de cepas bacterianas cultivables, procedentes de suelo B, inoculado con *B.pumilus* y su control (Tabla VI, Apéndice 1). El análisis de las rizobacterias cultivables nos permite detectar con mayor claridad que en el caso anterior no sólo la inoculación sino también las divergencias entre los suelos control.

Las distancias entre las distintas muestras de suelo inoculado y sus controles señalan la existencia de diferencias hasta las 2 semanas después de comenzar el experimento.

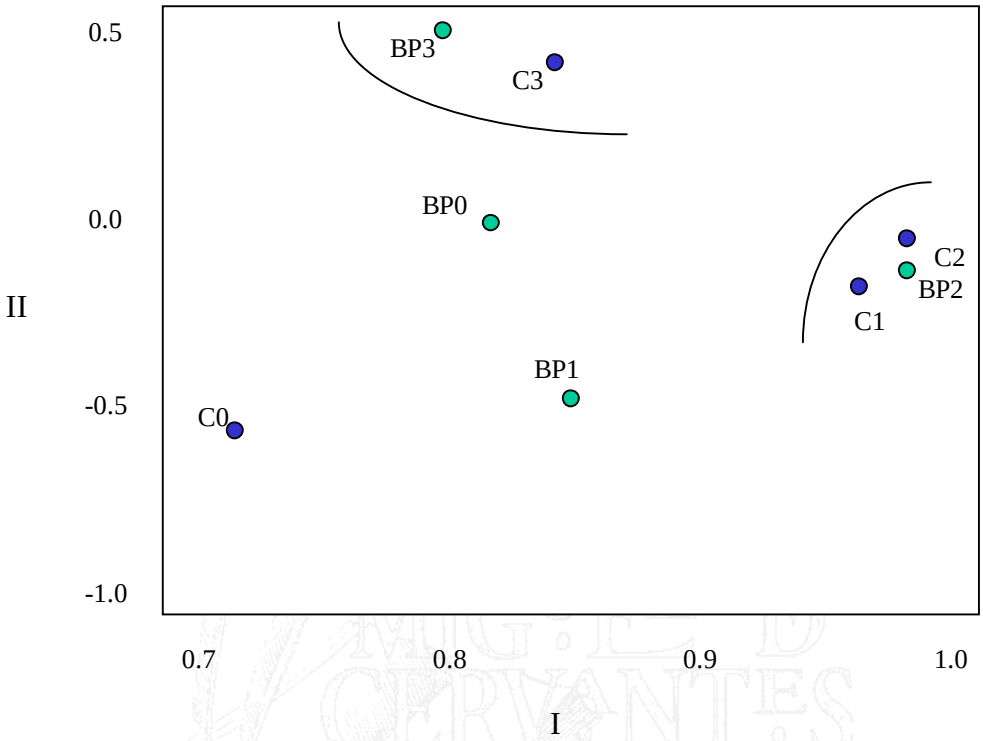


Figura 3.10. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.pumilus* (BP) y no inoculadas (control-C), en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2 , 3) (PLFAs de placa).

El ACP de las muestras de placa demuestra un efecto de las inoculaciones sobre las poblaciones rizosféricas a corto plazo ya que las muestras inoculadas se separan de T0 a T1 y de sus controles. Posteriormente, se detecta una aproximación a sus controles.

En este caso, los dos ejes principales absorben el 85,94 % de la varianza (Tabla 3.XIX). Los factores de carga que definen la separación de las muestras aparecen en la Tabla 3.XX.

Tabla 3.XIX. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	75,05	75,05
EJE II	10,89	85,94

Tabla 3.XX. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,661	0,490
2	br16:0	0,264	0,444
3	i16:0	0,278	0,061
4	16:1ω9	0,974	-0,074
5	16:1ω7c	0,046	0,142
6	16:1ω7t	0,646	-0,368
7	16:1ω5	-0,080	0,828
8	16:0	0,714	-0,356
9	br17:0	-0,854	0,173
10	Me16	0,874	0,314
11	i17	0,870	0,346
12	a17	0,787	0,483
13	17:1ω8	0,158	0,651
14	cy17	0,306	0,892
15	17:0	0,373	0,810
16	br18:0	-0,414	0,849
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	-0,414	0,849
19	18:1ω9	-0,024	0,878
20	18:1ω7	-0,786	0,165
21	18:1	-0,209	0,559
22	18:0	0,900	0,046
23	19:1a	-0,719	0,208
24	Me18	0,712	-0,400
25	19:1b	0,900	0,039
26	Cy19	0	0
27	20:4	0	0
28	20:5	0,046	0,142

3.1.1.3.b. Inoculación de *A.glutinosa* con *B.licheniformis*

El ACP (Figura 3.11) realizado con los resultados obtenidos en el análisis de PLFAs extraídos de suelo inoculados con *B.licheniformis* y de su control en el suelo B (Tabla VII, Apéndice 1), muestra la formación de 2 grupos bien diferenciados. En uno aparecen los controles a tiempo 1, 2 y 3, y se sitúa hacia los valores más altos del eje I e intermedios del eje II. El otro grupo está formado por el control a T0 y todas las muestras inoculadas, excepto BL0, que se separa de las demás, situándose hacia los valores más altos del eje II y más bajos del eje I.

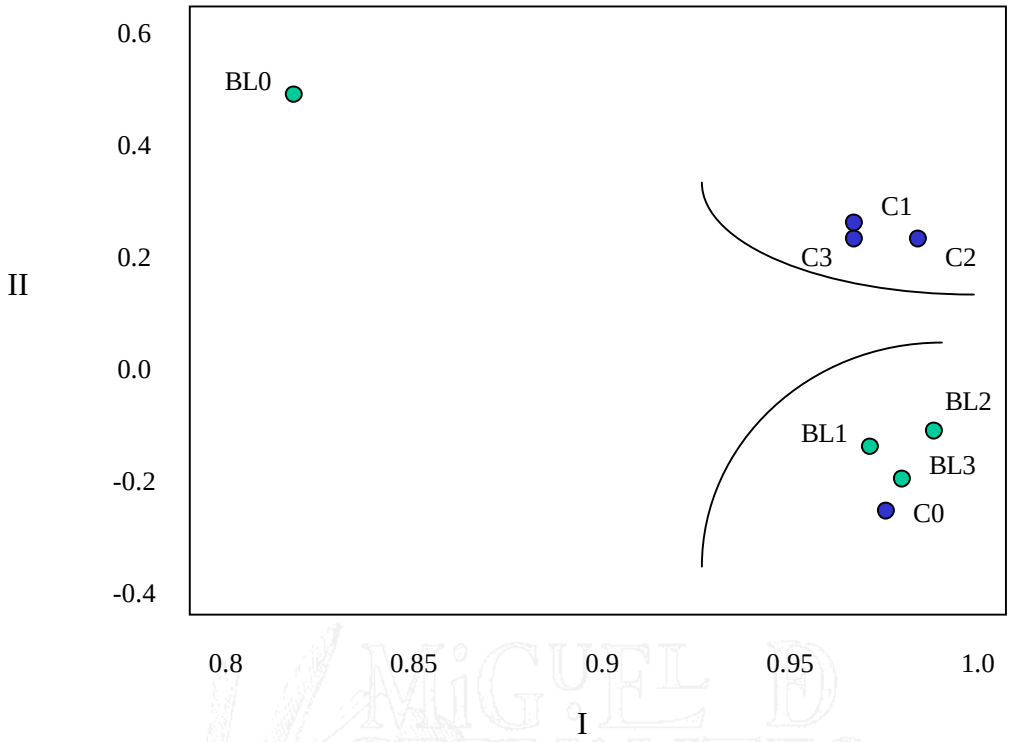


Figura 3.11. Representación del ACP efectuado con los resultados de los análisis de PLFAs extraídos de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B. licheniformis* (BL) y no inoculadas (control-C), en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2 , 3) (PLFAs de suelo)

El porcentaje total de la varianza que absorben los dos primeros ejes es el 95,06 % (Tabla 3.XXI) y los factores de carga que definen esta separación aparecen en la Tabla 3.XXII.

Tabla 3.XXI. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	89,88	89,88
EJE II	5,18	95,06

Tabla 3.XXII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,820	0,044
2	br16:0	0,939	0,315
3	i16:0	0	0
4	16:1ω9	0	0
5	16:1ω7c	0,425	0,852
6	16:1ω7t	0	0
7	16:1ω5	0	0
8	16:0	0	0
9	br17:0	0,087	0,995
10	Me16	0	0
11	i17	-0,564	-0,330
12	a17	0	0
13	17:1ω8	0	0
14	cy17	0	0
15	17:0	0	0
16	br18:0	0	0
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	0,836	0,224
19	18:1ω9	0	0
20	18:1ω7	-0,716	0,369
21	18:1	0,679	-0,064
22	18:0	0,764	-0,615
23	19:1a	0,594	-0,636
24	Me18	0	0
25	19:1b	0	0
26	Cy19	0	0
27	20:4	0	0

En cuanto al ACP (Figura 3.12) realizado con resultados de PLFAs extraídos de cepas bacterianas cultivables en placa (Tabla VIII, Apéndice 1), vemos el efecto de la inoculación sobre dichas poblaciones. Todas las muestras inoculadas se agrupan hacia los valores más altos de ambos componentes principales, mientras que los controles muestran una distribución variable a lo largo de ambos ejes.

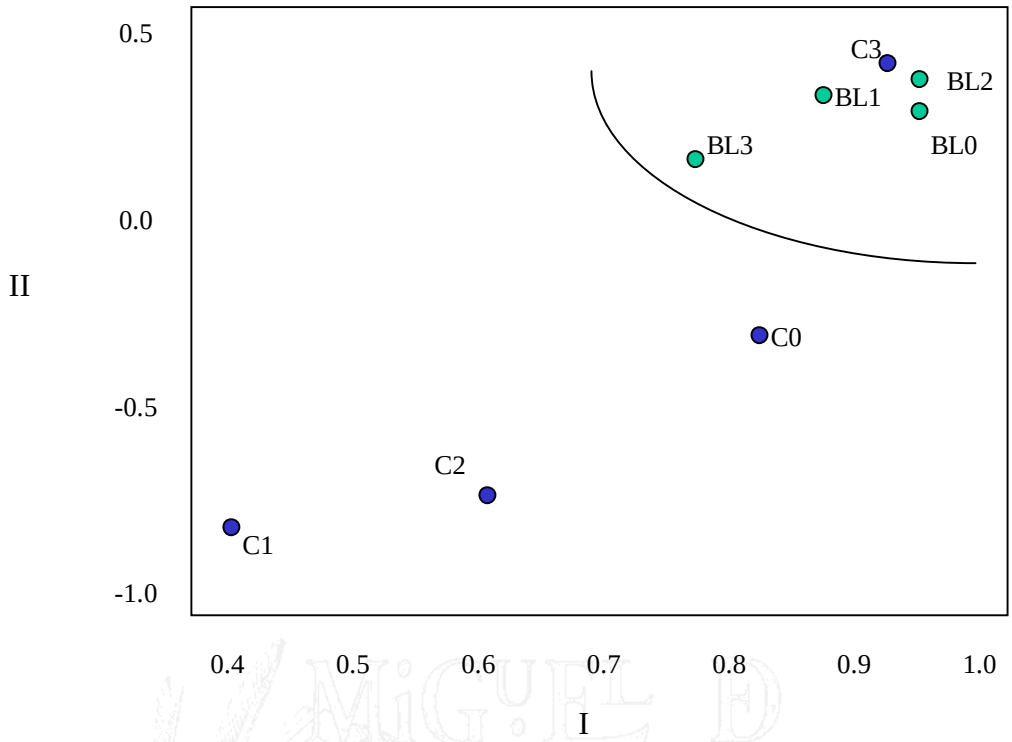


Figura 3.12. Representación del ACP efectuado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables procedentes de la rizosfera de plántulas inoculadas con *B.licheniformis* (BL) y no inoculadas (control-C), en el suelo B, en los cuatro tiempos de muestreo (0, 1, 2, 3) (PLFAs de placa).

Los ejes I y II absorben un 81,77 % de la varianza (Tabla 3.XXIII). Los factores de carga que determinan la separación de las muestras aparecen en la Tabla 3.XXIV.

Tabla 3.XXIII. Porcentaje de varianza absorbida por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	62,18	62,18
EJE II	19,59	81,77

Tabla 3.XXIV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	15:0	0,488	-0,081
2	br16:0	0,744	0,213
3	i16:0	0,860	0,303
4	16:1ω9	0,898	0,345
5	16:1ω7c	0,059	-0,389
6	16:1ω7t	0,681	0,288
7	16:1ω5	0,188	-0,655
8	16:0	0,593	0,703
9	br17:0	0,762	0,195
10	Me16	0,786	0,407
11	i17	0,884	-0,435
12	a17	0,896	0,057
13	17:1ω8	0,882	-0,424
14	cy17	0,596	-0,390
15	17:0	-0,318	0,544
16	br18:0	0,649	0,634
17	Me17	0	0
18	18:2ω6	-0,608	0,696
19	18:1ω9	0	0
20	18:1ω7	-0,728	0,584
21	18:1	-0,340	0,744
22	18:0	-0,303	0,557
23	19:1a	-0,140	0,889
24	Me18	0	0
25	19:1b	0	0
26	Cy19	0,535	0,353
27	20:4	-0,360	-0,774

3.1.2. Resultados del efecto de la inoculación de *A.glutinosa* con *B.pumilus* y *B.licheniformis* sobre el crecimiento

Los datos correspondientes a esta parte experimental aparecen en el Apéndice 1. Las Tablas en las que se exponen los datos llevan una numeración consecutiva de la IX a la XVI.

3.1.2.1. Inoculación de *A.glutinosa* en el suelo A

El ANOVA realizado con los datos de superficie aérea (Tabla IX, Apéndice 1), indica la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.01$), tiempos de muestreo ($p<0.01$) y en la interacción ($p<0.05$). La Figura 3.13 muestra como en T2 las plantas tratadas con *B.pumilus* desarrollan una superficie foliar significativamente mayor que el control. El efecto determinado por *B.licheniformis* es menor, de forma que, aunque la superficie es mayor a la de las plantas control, las diferencias no son significativas. En T3, la superficie de las plantas tratadas tanto con *B.pumilus* como con *B.lichenformis* es significativamente mayor que la de plantas no inoculadas (control). No obstante se aprecia una clara diferencia entre ambos tratamientos, siendo más eficaz la inoculación con *B.pumilus*.

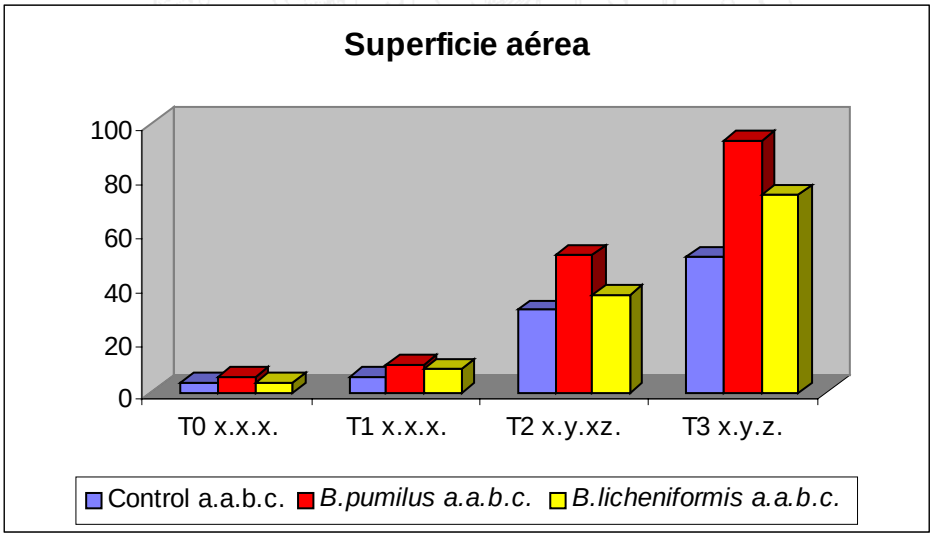


Figura 3.13. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y el control en los cuatro tiempos de muestreo. Las letras a,b,c indican las diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo y las letras x,y,z indican diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

La situación es semejante con respecto a la longitud aérea, medida desde el cuello de la raiz hasta el ápice del brote. Los datos aparecen en la Tabla X (Apéndice 1) y en la Figura 3.14. El ANOVA indica la existencia de diferencias significativas ($p<0.01$) entre tratamientos y tiempos de muestreo, pero no en la interacción. Las diferencias comienzan a detectarse a las 6 semanas de la inoculación, siendo notables las de *B.pumilus* con respecto al control y menos acusadas en el caso de *B.licheniformis*.

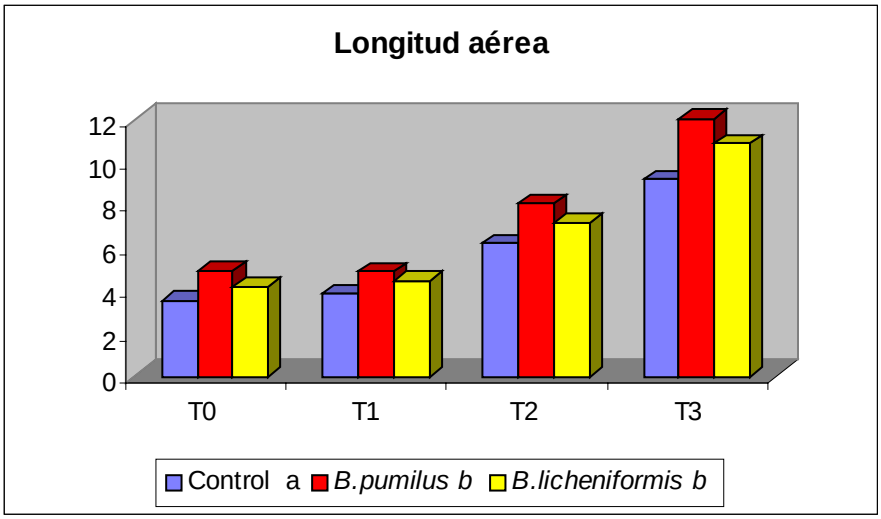


Figura 3.14. Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y el control en los cuatro tiempos de muestreo. Las letras a,b,c indican las diferencias entre tratamientos considerando la media de los cuatro tiempos; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

Con respecto a los resultados de superficie radical (Tabla XI, Apéndice 1), el ANOVA indica que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$) y entre tiempos de muestreo ($p<0.01$), mientras que para los resultados de longitud radical (Tabla XII, Apéndice 1), estas diferencias son significativas sólo entre tiempos de muestreo ($p<0.01$). En las Figuras 3.15 y 3.16, podemos observar como los incrementos de crecimiento más acusados en superficie y longitud, respectivamente, se producen entre T1 y T2 y entre T2 y T3.

Tanto la superficie como la longitud radical son comparables al comienzo del experimento para todos los tratamientos, y no presentan diferencias. En T1 empiezan a aparecer diferencias entre las plántas inoculadas y las no inoculadas, y estas diferencias son más acusadas en T2, alcanzándose valores más altos bajo la influencia de ambos inóculos. De T2 a T3 se observa un considerable incremento de longitud y superficie radical, tanto en las plantas inoculadas como no inoculadas, aunque como se indicó anteriormente, sólo son significativas las diferencias relativas a la superficie radical entre tratamientos.

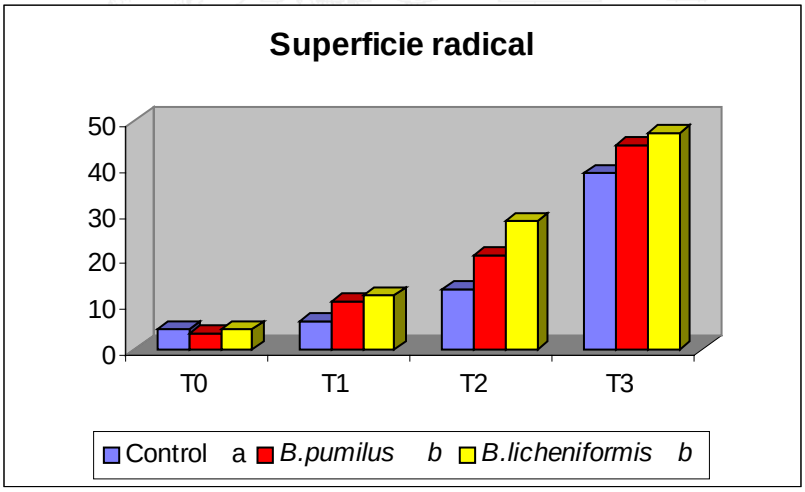


Figura 3.15: Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y el control en los cuatro tiempos de muestreo. Las letras a, b, c indican las diferencias entre tratamientos; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

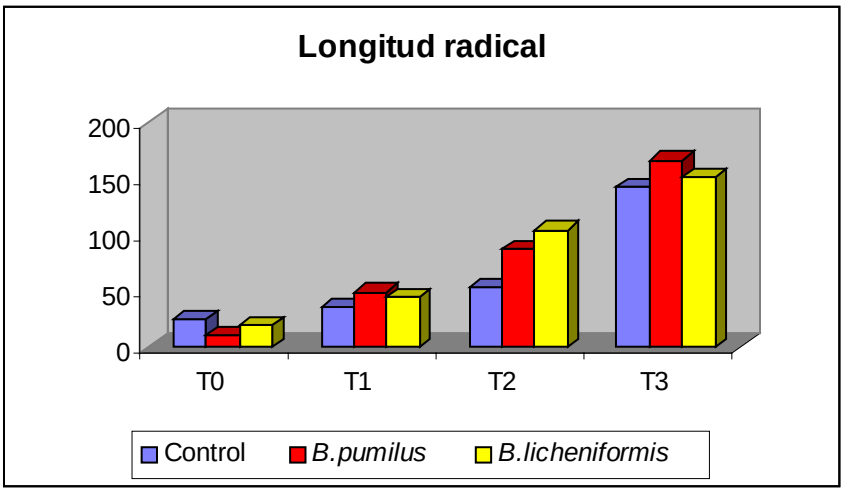


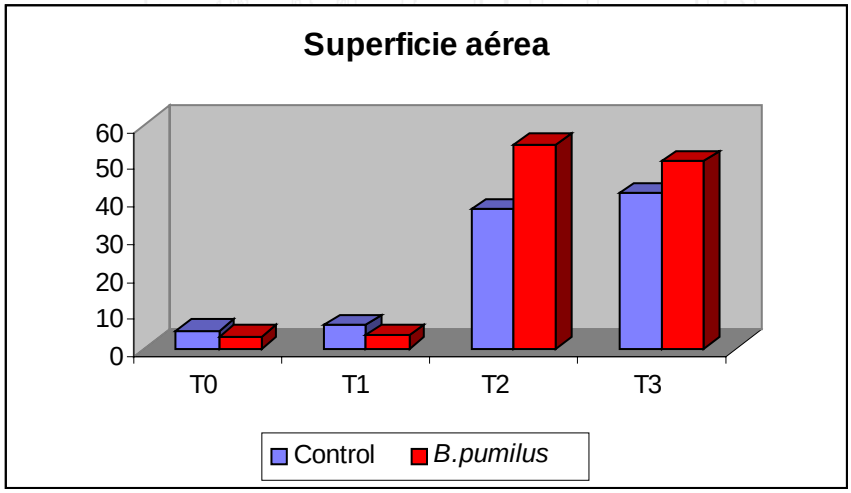
Figura 3.16: Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y el control en los cuatro tiempos de muestreo.

3.1.2.2. Inoculación de *A.glutinosa* en el suelo B

Las inoculaciones de *A.glutinosa* con *B. pumilus* o *B. licheniformis* en el suelo B se llevaron a cabo en distintos momentos, por lo que cada tratamiento tiene su control y por lo tanto, cada parámetro aparece representado en gráficas separadas.

El ANOVA realizado con los datos de superficie aérea (Tabla XIII, Apéndice 1) detecta diferencias significativas ($p<0.01$) entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento, tanto en la inoculación con *B.pumilus* como con *B.licheniformis*.

En la Figura 3.17, se muestra el marcado incremento que existe en ambos casos de T1 a T2, sin que existan diferencias significativas entre tratamientos con respecto a sus controles.



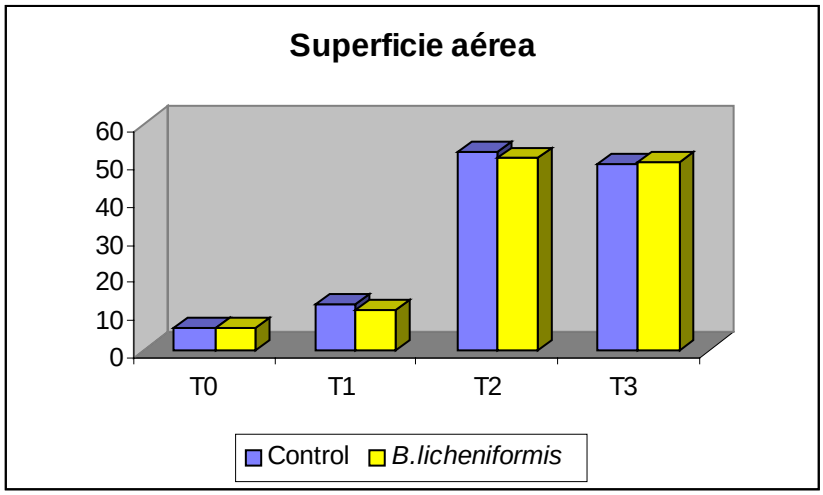


Figura 3.17: Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* y *B.licheniformis* sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo.

Con respecto a la longitud aérea (Tabla XIV, Apéndice 1), el ANOVA detecta diferencias significativas ($p<0.01$) entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento tanto en la inoculación con *B.pumilus* como con *B.licheniformis*.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

La Figura 3.18 muestra el incremento de longitud aérea, que como en el caso de la superficie aérea, es más acusado de T1 a T2, sin que las diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo sean significativas con respecto a sus controles.

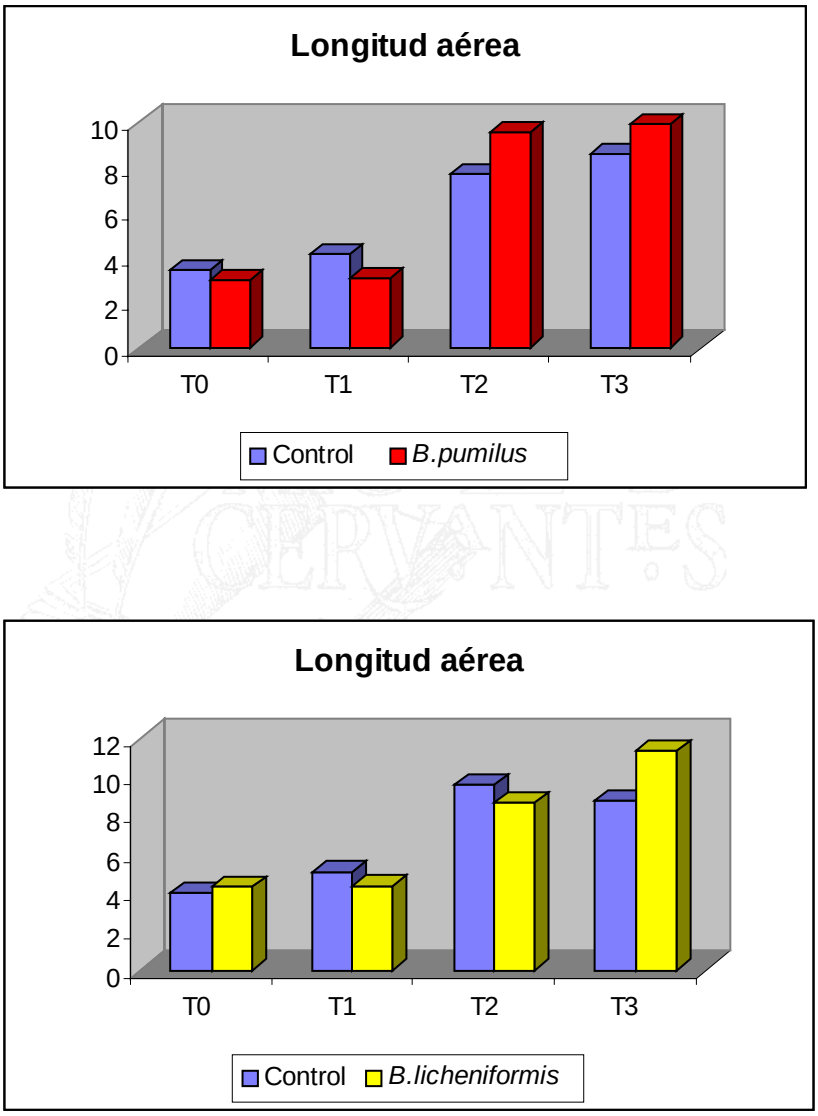


Figura 3.18: Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo.

El ANOVA realizado con los resultados obtenidos en el estudio del sistema radical indica que existen diferencias significativas ($p<0.01$) entre tratamientos, tiempos de muestreo y en la interacción, tanto en el caso de la inoculación con *B.pumilus* como con *B.licheniformis*. Los resultados de superficie y longitud radical aparecen en las Tablas XV y XVI (Apéndice 1), y en las Figuras 3.19 y 3.20, respectivamente. Partiendo de plantas que presentan un sistema radical de estructura muy semejante, los mayores incrementos en la superficie radical se detectan entre T1 y T2 y entre T2 y T3, siendo significativos para plantas inoculadas y no inoculadas; sin embargo, tanto en el caso *B.pumilus* como en el de *B.licheniformis*, los incrementos son más acusados, alcanzándose valores significativamente mayores en plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. En cuanto a la longitud radical en el caso de *B.pumilus* se detecta una aceleración en la elongación radical, ya que las diferencias con el control son significativas en T2, aunque desaparecen en T3. Sin embargo, el efecto de *B.licheniformis* es más lento.

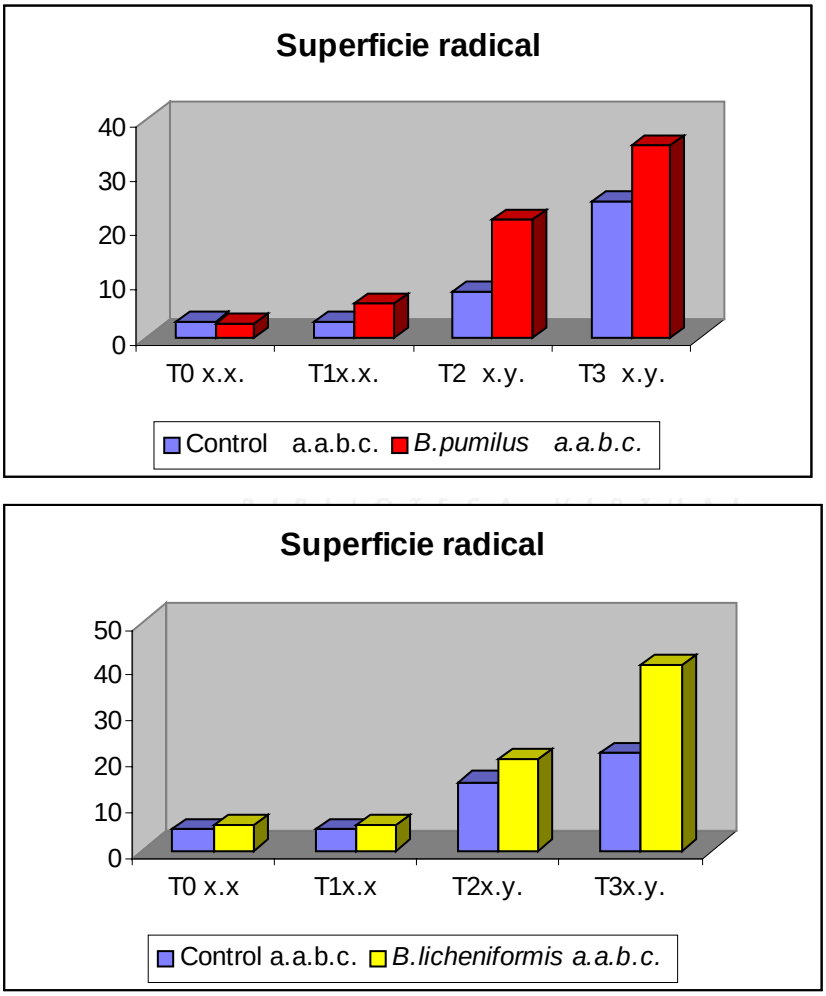
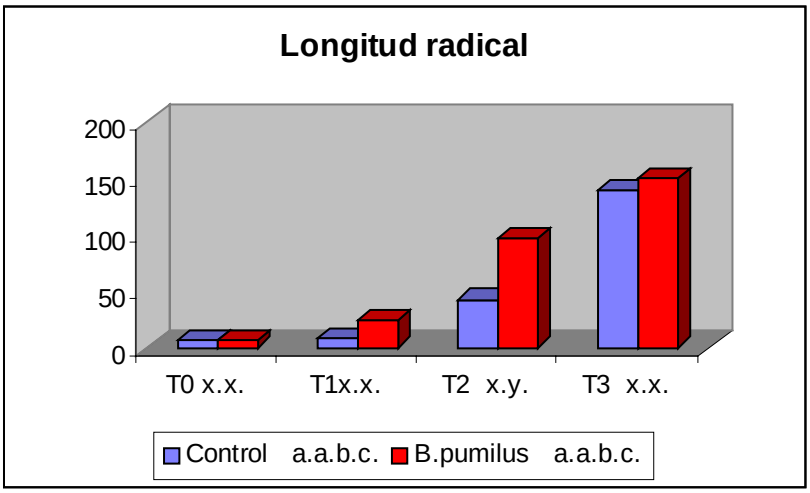


Figura 3.19. Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo. Las letras a,b,c indican las diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo y las letras x,y,z indican diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

Ambos tratamientos resultan igual de efectivos con respecto a los parámetros radicales, alcanzando valores finales similares, sin embargo, *B.licheniformis* resultó más efectivo comparándolo con su control. Esto sugiere que ambos tratamientos, en este suelo, afectan a la parte radical, aunque las alteraciones inducidas no se reflejan en la parte aérea como ocurría en los suelos procedentes de aliseda (suelo A).



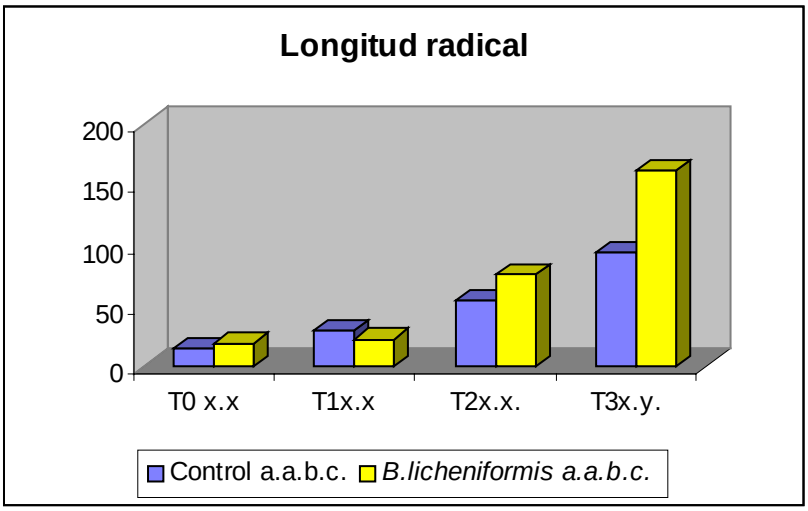


Figura 3.20. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo. Las letras a,b,c indican las diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo y las letras x,y,z indican diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

3.2. Resultados obtenidos en el estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* y *P. pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en invernadero

3.2.1. Monitorización de las inoculaciones mediante análisis del perfil de fosfolípidos de membrana (PLFAs)

Las muestras se procesaron según se ha descrito en el apartado 2.1.4. de Materiales y Métodos.

Los resultados del análisis de PLFAs se organizaron en 5 matrices, 4 de ellas corresponden al diseño factorial de los 2 tratamientos (*B. pumilus* o *B. licheniformis*), x 2 tipos de análisis, perfil de ácidos grasos de bacterias cultivables procendentes de la rizosfera (PLFAs de placa) y perfil de ácidos grasos de las bacterias viables y no viables extraídos directamente de la rizosfera de las plántulas inoculadas y no inoculadas de *Alnus glutinosa* (PLFAs de suelo). Las 4 matrices correspondientes a *A. glutinosa* constaban de 28 filas x 7 columnas; las filas corresponden a los ácidos grasos analizados y las columnas al control y los tratamientos (*B. pumilus* o *B. licheniformis*), en cada tiempo de muestreo (T0: a las 72 h de inocular, T1a: a las 4 semanas, antes de la segunda inoculación, T1d: 24 h después de la segunda inoculación, y T2: a las 8 semanas de la primera inoculación para las inoculadas, y T0, T1 y T2 para los controles); los datos corresponden a la media de tres réplicas.

La quinta matriz, definida por los resultados obtenidos con *P. pinea*, recoge los datos de ácidos grasos procedentes de las bacterias cultivables extraidas de la rizosfera de plántulas de *P. pinea*, inoculadas con los 2 tratamientos (*B. pumilus* o *B. licheniformis)* y no inoculadas (control), en T1, tras 72 h de la segunda inoculación, a las 4 semanas de la primera, y T2, a las 8 semanas de la primera inoculación. Esta matriz consta de 25 filas x 6 columnas y los datos corresponden a la media de trés réplicas.

Con los datos de cada matriz (Tablas XVII a XXI, apéndice 1) se realizó un ACP.

3.2.1.1. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *Alnus glutinosa* inoculada con *B. pumilus* y *B. licheniformis* en turba-arena

3.2.1.1.a . Inoculación de *A. glutinosa* con *B. pumilus*

La representación del ACP correspondiente a los ácidos grasos extraídos de la rizosfera (PLFAs de suelo) de plántulas de aliso inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas (control) (Tabla XVII, Apéndice 1) aparece en la Figura 3.21.

En la Figura se puede apreciar la agrupación de las muestras inoculadas y su control en T0. La situación es la misma en T1 antes de la inoculación, aunque se observa una separación de las muestras de T1 con respecto a las de T0. Sin embargo, tras la inoculación, BP1d se separa

de su control. En T2, se mantiene una separación entre BP2 y C2, aunque las comunidades bacterianas evolucionan paralelamente en ambas muestras.

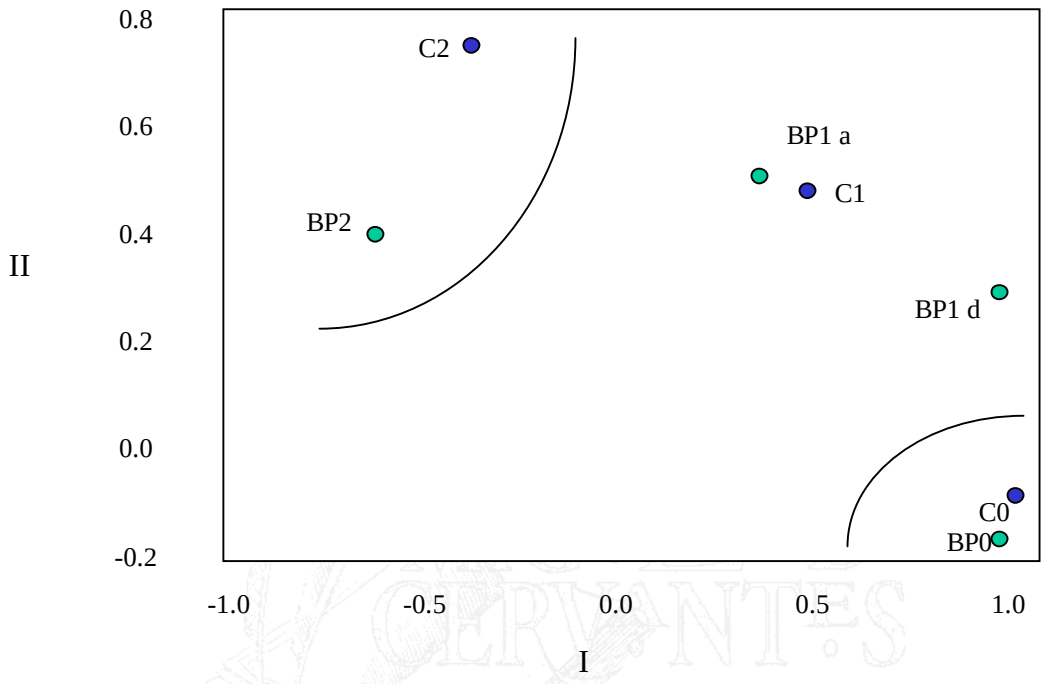


Figura 3.21. Representación del ACP correspondiente a los datos de PLFAs extraídos de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* (BP) y no inoculadas (control-C) en los tres tiempos de muestreo determinados (T0, 72 h después de la inoculación, T1, a las 4 semanas, T1a, antes de la segunda inoculación, T1d, 24 h después de la segunda inoculación, T2, a las 8 semanas de la primera inoculación). Ensayos realizados sobre turba arena. (PLFAs de suelo)

Los ejes I y II absorben el 61,06 % de la varianza (Tabla 3.XXV.). Los factores de carga que determinan la separación sobre los ejes principales aparecen en la Tabla 3.XXVI

Tabla 3.XXV. Porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	39,35	39,35
EJE I	21,71	61,06

Tabla 3.XXVI. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	i15	-0,798	0,493
2	a15:0	0,820	0,460
3	15:0	-0,055	-0,317
4	br16:0	-0,307	-0,822
5	i16:1	-0,796	0,499
6	i16:0	-0,802	0,475
7	16:1ω7c	0,820	0,460
8	16:1ω5	0,069	-0,905
9	16:0	0,514	0,278
10	br17:0	-0,073	-0,731
11	Me16	-0,799	0,430
12	i17	0,801	-0,053
13	a17	0,820	0,460
14	17:1ω8	-0,567	0,106
15	Cy17	0	0
16	17:0	-0,112	-0,692
17	br18:0	-0,294	-0,840
18	Me17	-0,466	0,520
19	18:2ω6	-0,464	0,021
20	18:1ω9	0,693	-0,560
21	18:1ω7	0,020	-0,576
22	18:1	0,167	0,013
23	18:0	0	0
24	19:1a	0,099	-0,370
25	Me18	0,817	0,460
26	Cy19	-0,314	-0,262
27	20:4	0,667	-0,629
28	20:0	0,906	0,149

El ACP realizado con los datos de PLFAs de placa correspondientes (Tabla XVIII, Apéndice 1) aparece representado en la Figura 3.22, y refleja el comportamiento de la comunidad rizosférica cultivable. La ordenación determinada por el ACP indica en este caso, una alteración más acusada de la comunidad rizobacteriana tras la primera inoculación, no obstante, tanto BP1a como BP1d son los que alcanzan las máximas diferencias con respecto al control no inoculado. La comunidad rizosférica cultivable de los controles apenas varía y confluye con la rizosfera de plantas inoculadas en T2.

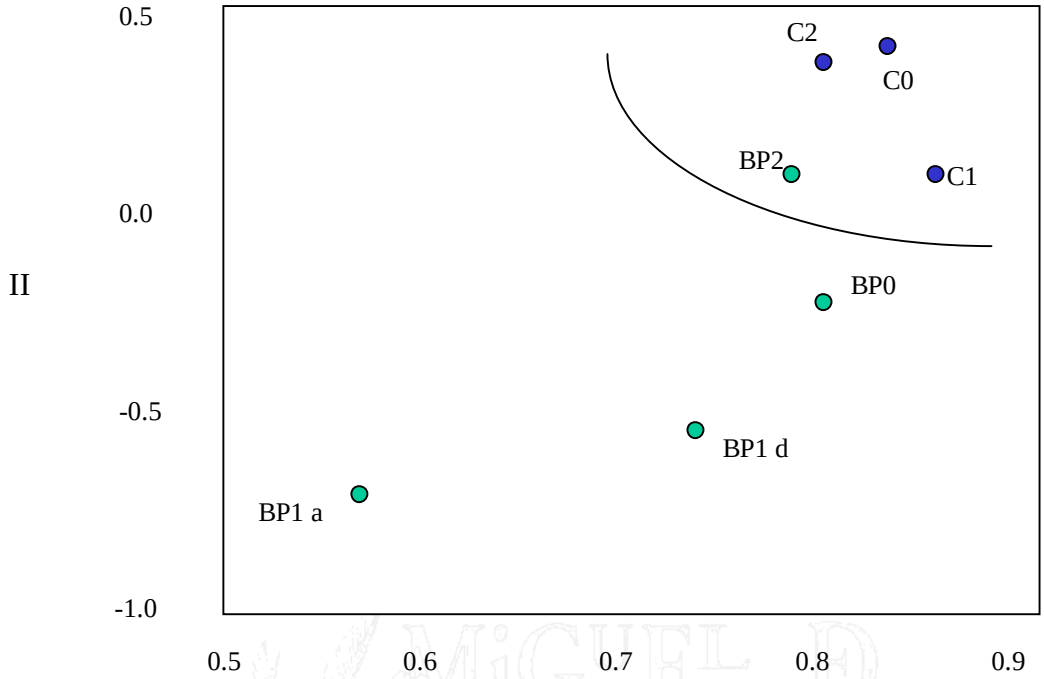


Figura 3.22. Representación del ACP correspondiente a los datos de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* (BP) y no inoculadas (control), en los tres momentos de muestreo determinados (T0, 72 h después de la inoculación, T1, a las 4 semanas, T1a antes de la segunada inoculación, T1d, 24 h después, y T2, 8 semanas después de la primera inoculación. Ensayos realizados sobre turba-arena (PLFAs de placa)

Tabla 3.XXVII. Porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes.

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	56,46	56,46
EJE I	17,54	74,00

En este ACP, los ejes I y II absorben el 74,00 % de la varianza (Tabla 3.XXVII). Los factores de carga que más influyen en la separación son el 18:1ω9 y a17 hacia los valores más positivos y negativos del eje 1, respectivamente, mientras que en el eje 2 son el 18:0 y en cy17, respectivamente (Tabla 3.XVIII)

Tabla 3.XXVIII. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes

		EJE I	EJE II
1	i15	0	0
2	a15:0	0,118	-0,311
3	15:0	0,516	-0,176
4	br16:0	0,832	0,408
5	i16:1	0	0
6	i16:0	0,292	0,102
7	16:1ω7c	0	0
8	16:1ω5	-0,332	-0,412
9	16:0	0,608	0,211
10	br17:0	0,215	-0,818
11	Me16	-0,772	-0,426
12	i17	-0,452	0,387
13	a17	-0,808	-0,390
14	17:1ω8	-0,347	-0,711
15	Cy17	-0,284	-0,918
16	17:0	0,751	-0,020
17	br18:0	0,773	0,399
18	Me17	-0,652	0,676
19	18:2ω6	0,341	0,337
20	18:1ω9	0,864	0,384
21	18:1ω7	0,546	-0,380
22	18:1	0,404	0,380
23	18:0	0,136	0,816
24	19:1a	-0,077	-0,809
25	Me18	-0,686	0,618

3.2.1.1.b. Inoculación de *A. glutinosa* con *B. licheniformis*

La representación del ACP realizado con los resultados del análisis de PLFAs extraídos de suelo rizosférico de plántulas de aliso, inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control), (Tabla 3.XIX, Apéndice 1) aparece en la Figura 3.23. La ordenación de las muestras refleja una alteración de la comunidad rizobacteriana tanto en T0 como en T1. Se puede apreciar como a las 4 semanas se han producido cambios apreciables en la comunidad rizobacteriana tanto en las muestras inoculadas como en el control, aunque se produce una aproximación entre ellas, (BL1a y C1). Posteriormente la segunda inoculación produce otra alteración en la comunidad bacteriana, separandose BL1d de las muestras anteriores. Esta separación se mantiene, haciendose incluso más acusada a las ocho semanas (T2). A lo largo del experimento se aprecia una evolución de todas las muestras desde los valores más negativos hacia los más positivos del eje II.

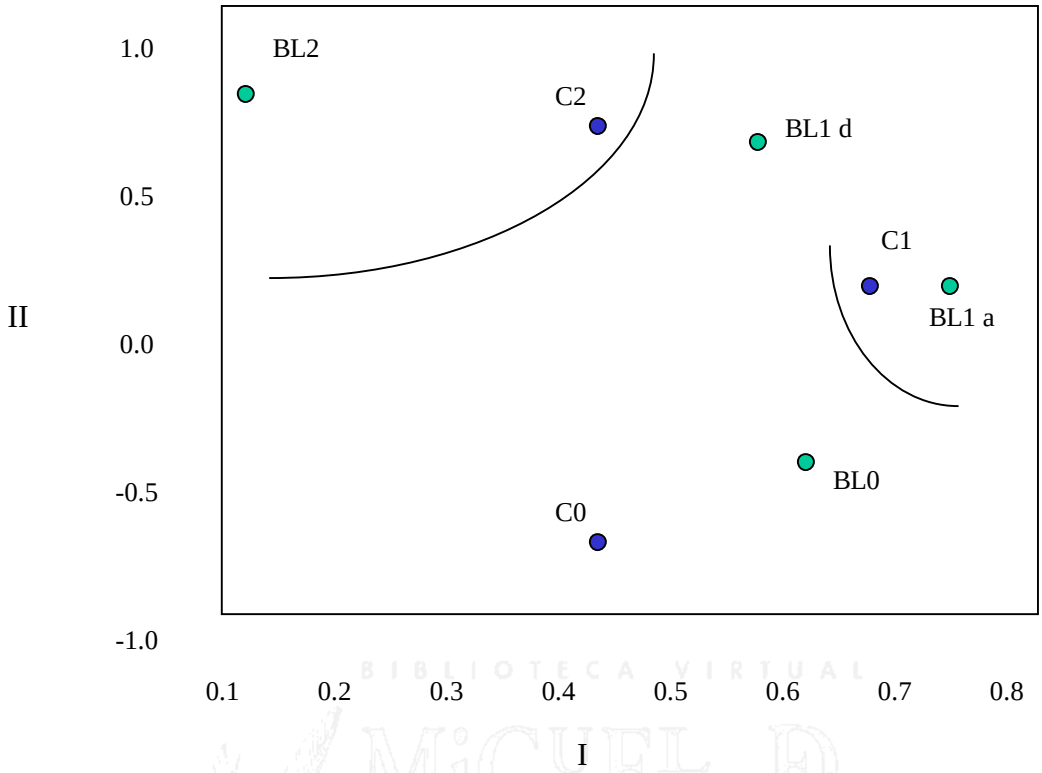


Figura 3.23. Representación del ACP correspondiente a los datos de PLFAs extraídos de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* (BL) y no inoculadas (control-C), en los tres tiempos de muestreo determinados (T0, 72 h después de la inoculación, T1, a las 4 semanas, T1a, antes de la segunda inoculación, T1d, 24 h después, T2, a las 8 semanas de la primera inoculación). Ensayos realizados sobre turba arena. (PLFAs de suelo)

El porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes es de un 58,23 % (Tabla 3.XXIX y los factores de carga que definen la separación aparecen en la Tabla 3.XXX.

Tabla 3.XXIX. Porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes.

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	32,38	32,38
EJE I	25,85	58,23

Tabla 3.XXX. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes.

		EJE I	EJE II
1	i15	0,344	0,508
2	a15:0	-0,985	0,009
3	15:0	0,056	-0,039
4	br16:0	0,755	-0,120
5	i16:1	0,344	0,508
6	i16:0	0,435	0,662
7	16:1ω7c	-0,981	0,019
8	16:1ω5	0,405	-0,904
9	16:0	-0,987	0,012
10	br17:0	0,213	-0,642
11	Me16	0,441	0,671
12	i17	-0,983	0,018
13	a17	-0,987	0,013
14	17:1ω8	0,507	-0,113
15	Cy17	-0,621	0,052
16	17:0	0,389	-0,897
17	br18:0	0,538	-0,327
18	Me17	0	0
19	18:2ω6	-0,096	0,305
20	18:1ω9	-0,254	-0,925
21	18:1ω7	0,107	-0,599
22	18:1	0,187	0,744
23	18:0	0,321	-0,521
24	19:1a	0,066	-0,389
25	Me18	-0,972	0,002
26	Cy19	0,329	0,513
27	20:4	-0,415	-0,251
28	20:0	-0,986	0,015

El ACP realizado con los datos correspondientes a los PLFAs extraídos de las bacterias cultivables en placa, procedentes de la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B. licheniformis* y no inoculadas (control), (Tabla 3.XX, Apéndice 1) aparece en la Figura 3.24.

En las muestras no inoculadas los cambios de la comunidad bacteriana cultivable son menos acusados que los detectados en la comunidad bacteriana total (PLFAs de suelo). Las muestras inoculadas y no inoculadas se separan en T0 en función de las variables que más peso tienen sobre el eje II. Las muestras no inoculadas se agrupan hacia los valores más positivos de ambos ejes, mientras que las inoculadas se separan a lo largo del eje I en T1 y T2. La segunda inoculación produce un acusado desplazamiento de la muestra BL1d, hacia los valores más bajos de ambos ejes, lo que la separa de la muestra BL1a, que se sitúa hacia los valores más altos del eje I.

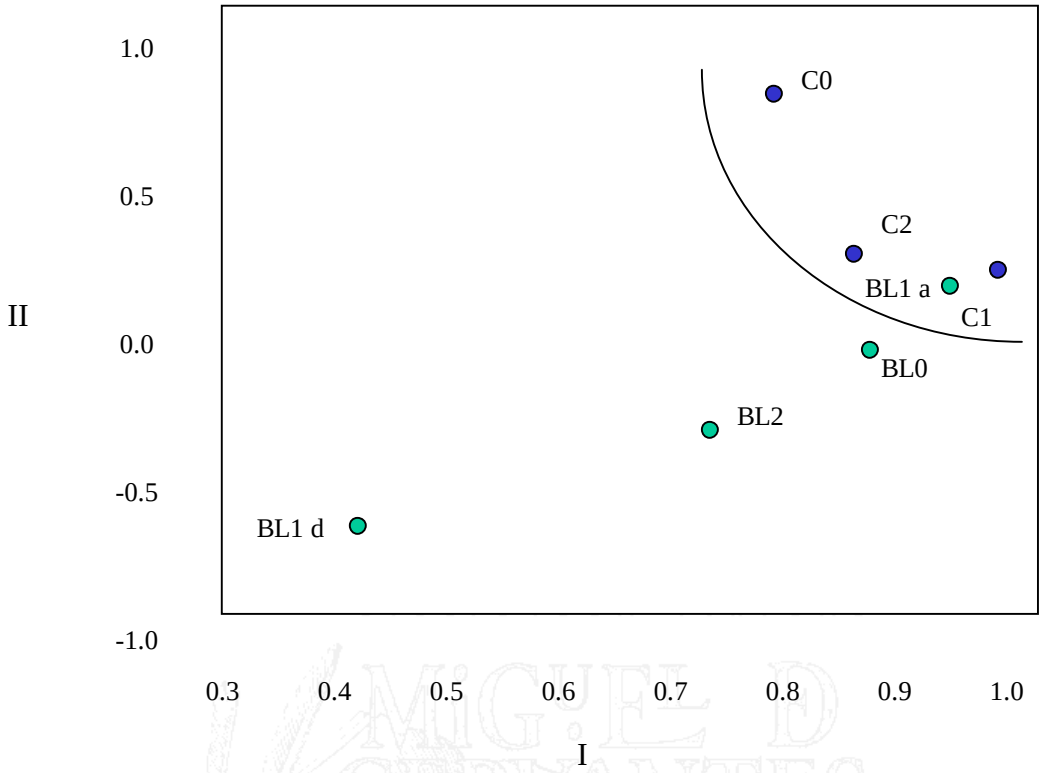


Figura 3.24. Representación del ACP correspondiente a los datos de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. licheniformis* (BL) y no inoculadas (control-C), en los tres momentos de muestreo determinados (T0, 72 h después de la inoculación; T1, a las 4 semanas, T1a, antes de la segunda inoculación, T1d, 24 h de la segunda; T2, a las 8 semanas de la primera inoculación). Ensayos realizados sobre turba-arena (PLFAs de placa)

El porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes es del 80,53 % (Tabla 3.XXXI). Los factores de carga que determinan la separación sobre los ejes principales aparecen en la Tabla 3.XXXII.

Tabla 3.XXXI. Porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes.

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	62,30	62,30
EJE I	18,23	80,53

Tabla 3.XXXII. Factores de carga de las variables sobre los dos ejes principales

		EJE I	EJE II
1	i15	0,544	0,759
2	a15:0	-0,599	0,633
3	15:0	0,355	-0,367
4	br16:0	0,322	-0,693
5	i16:1	-0,203	-0,008
6	i16:0	0,721	0,422
7	16:1ω7c	0,551	0,789
8	16:1ω5	-0,450	0,619
9	16:0	0	0
10	br17:0	0,973	-0,090
11	Me16	-0,877	0,273
12	i17	0,306	0,740
13	a17	-0,436	0,854
14	17:1ω8	0,727	0,454
15	Cy17	-0,324	-0,499
16	17:0	0,684	0,288
17	br18:0	0,667	-0,326
18	Me17	-0,734	-0,003
19	18:2ω6	-0,265	0,621
20	18:1ω9	0,551	0,789
21	18:1ω7	0,794	-0,185
22	18:1	0,433	-0,080
23	18:0	-0,806	0,317
24	19:1a	-0,084	0,337
25	Me18	-0,811	-0,063

3.2.1.2. Perfil de ácidos grasos de la rizosfera de *Pinus pinea*, inoculada con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, en turba-arena

Tras la inoculación de plántulas de *P. pinea* con *B. pumilus* o *B. licheniformis*, se monitoriza la colonización de la rizosfera mediante el análisis del perfil de ácidos grasos extraídos de cepas bacterianas viables y cultivables, procedentes de su rizosfera (PLFAs de placa). Los datos aparecen en la Tabla XXI (Apéndice 1). Los tiempos de muestreo aparecen como T1 y T2, que corresponden a las 72 h tras la segunda inoculación y a las 4 semanas de ésta, es decir, a las ocho semanas de comienzo del experimento.

En la Figura 3.25 aparece la ordenación de las muestras de ambos tratamientos y el control, se observa una separación de las muestras después de la inoculación. Posteriormente, a las cuatro semanas (T2), confluyen hacia los valores más positivos del eje I y más negativos del eje II.

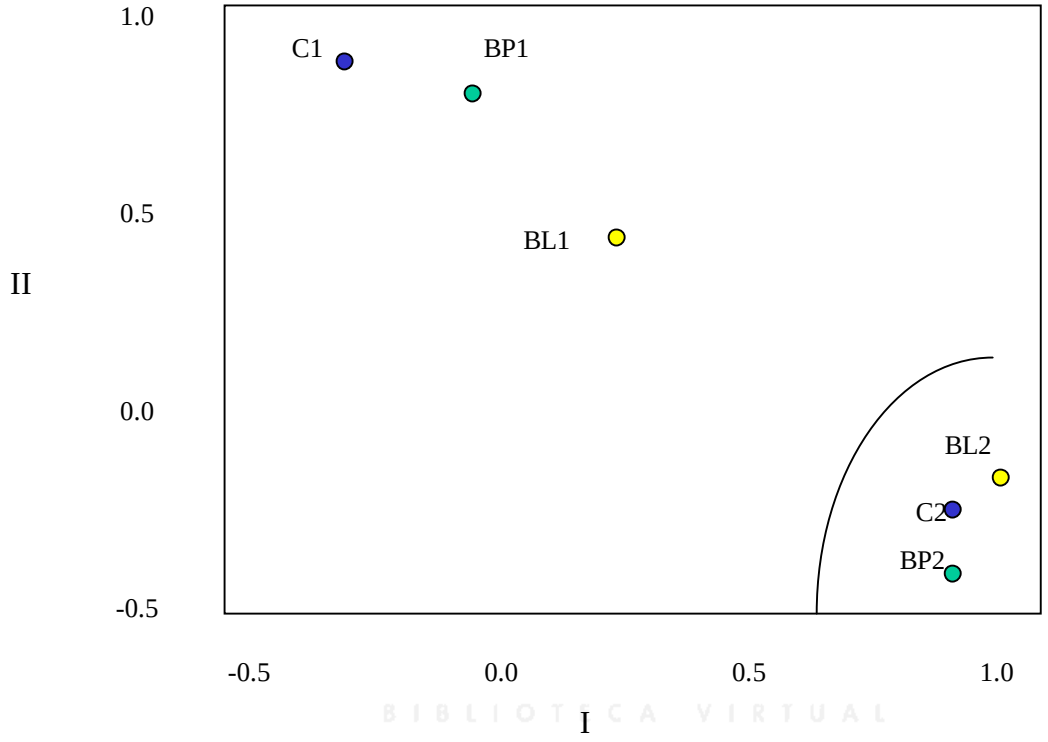


Figura 3.25. Representación del ACP efectuado con los datos de PLFAs extraídos de las cepas bacterianas cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *Pinus pinea*, inoculadas con *B. licheniformis* (BL), o *B. pumilus* (BP) y no inoculadas (control-C) en los dos tiempos de muestreo (T1, a las 72 h de la segunda inoculación, y T2, a las 4 semanas de la segunda inoculación). Ensayos realizados sobre turba arena (PLFAs de placa)

Los dos ejes principales absorben el 68,89 % de la varianza (Tabla 3.XXXIII). Los factores de carga que definen la separación sobre los dos ejes principales aparecen reflejados en la Tabla 3.XXXIV.

Tabla 3.XXXIII. Porcentaje de la varianza absorbido por los dos primeros ejes.

	% VARIANZA	% ACUMULADO
EJE I	44,45	44,45
EJE II	24,44	68,89

Tabla XXXIV. Factores de carga de las variables sobre los dos primeros ejes.

		EJE I	EJE II
1	14:0	0,722	-0,584
2	a15	0,061	-0,989
3	15:0	0,814	-0,551
4	br16:0	0,548	0,651
5	i16:1	0,422	-0,170
6	i16:0	0,749	0,352
7	16:1ω7c	0,924	-0,377
8	16:1ω7t	-0,871	0,216
9	16:1ω5	0,902	-0,270
10	16:0	0,819	0,571
11	br17:0	-0,887	0,021
12	Me16	0,708	-0,698
13	i17	0,050	-0,980
14	a17	0,841	0,484
15	17:1ω8	0,988	-0,065
16	cy17	-0,907	0,299
17	17:0	-0,758	0,524
18	br18:0	0,542	0,596
19	18:2ω6	0,185	0,773
20	18:1ω9	0,856	0,493
21	18:1ω7	0,092	0,176
22	18:1	-0,446	-0,734
23	18:0	0,747	-0,412
24	19:1a	0,460	0,398
25	Me18	0,442	0,205
26	cy19	-0,539	-0,671

3.2.2. Resultados del efecto de la inoculación de *A. glutinosa* y *P. pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* sobre el crecimiento

Los resultados correspondientes a los resultados de las medidas biométricas se recogen en el Apéndice 1, Tablas de la XXII a la XXIX.

3.2.2.1. Inoculación de *Alnus glutinosa*

Los resultados de longitud aérea aparecen en la Tabla XXII (Apéndice 1). El ANOVA realizado con estos datos indica que existen diferencias significativas ($p<0,01$) solamente entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento.

En la Figura 3.26 se pueden observar incrementos de longitud semejantes bajo la influencia de los tratamientos.

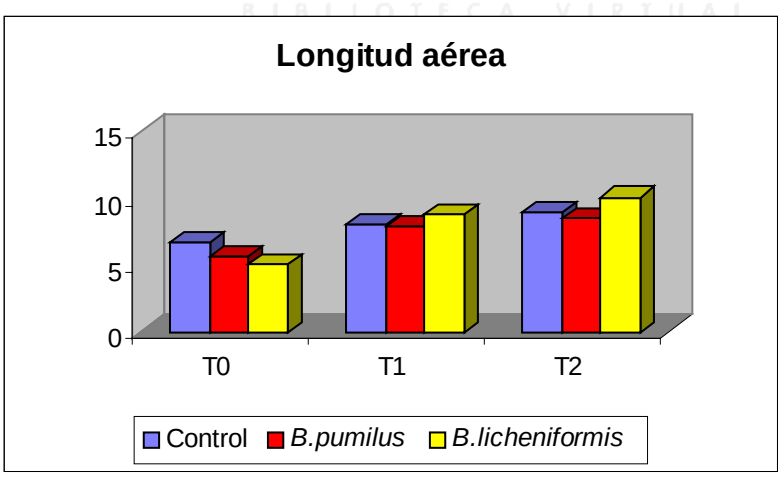


Figura 3.26. Resultados de longitud aérea de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo.

El ANOVA realizado con los datos de superficie aérea (Tabla XXIII, Apéndice 1) indica que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$), entre tiempos de muestreo ($p<0,01$) y en la interacción ($p<0,01$). La representación de los resultados aparece en la Figura 3.27.

A pesar de que las plantas inoculadas con los dos tratamientos presentaban una superficie foliar significativamente menor que las no inoculadas (control) al inicio del experimento, se observa un apreciable efecto estimulador de la inoculación sobre la superficie aérea con ambos tratamientos. En todos los tiempos de muestreo, el incremento provocado por *B. licheniformis* es significativamente mayor que el causado por *B. pumilus*, y en ambos casos se alcanzan valores mayores que en las plantas no inoculadas al final del experimento.

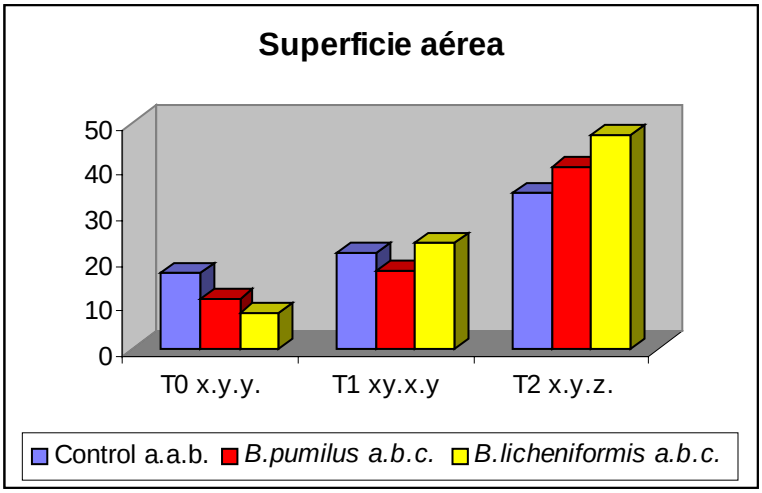


Figura 3.27. Resultados de superficie aérea de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Las letras a,b,c indican las diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo y las letras x,y,z indican diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0,05$)

En cuanto a los datos de longitud radical (Tabla XXIV, Apéndice 1), el ANOVA indica que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$) y entre tiempos de muestreo ($p<0,01$), pero no en la interacción. Los resultados aparecen representados en la Figura 3.28.

Las diferencias entre los tratamientos se deben al mayor tamaño de las plantas control en las primeras etapas del experimento. Por lo tanto no se aprecian diferencias en este parámetro debidas a la inoculación.

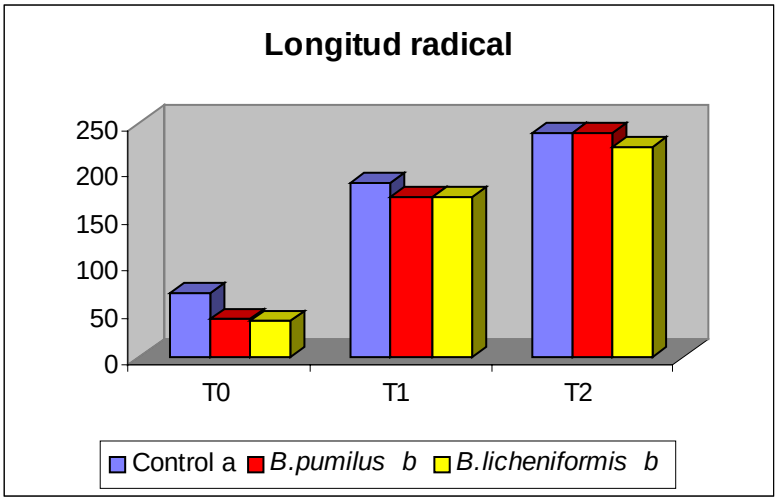


Figura 3.28. Resultados de longitud radical de plántulas de *A. glutinosa*, inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Las letras a,b,c indican las diferencias entre tratamientos considerando la media de los tiempos de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0,05$)

El ANOVA realizado con los datos de superficie radical (Tabla XXV, Apéndice 1) indica la existencia de diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05), tiempos de muestreo (p<0,01) y en la interacción (p<0,05). Estos resultados aparecen representados en la Figura 3.29.

Las plántas inoculadas con *B. licheniformis* presentan valores significativamente mayores que *B. pumilus*, y que las no inoculadas, mientras que las inoculadas con *B. pumilus*, no presentan diferencias significativas con las control en ningún momento de muestreo.

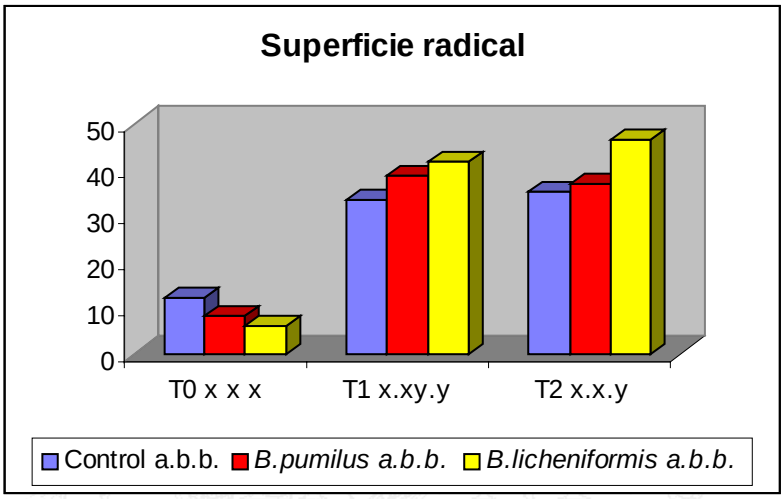


Figura 3.29: Resultados de superficie radical de las plantas (*A. glutinosa)* inoculadas con *B. pumilus* y *B. licheniformis* y el control en los tres tiempos de muestreo. Las letras a, b, c indican las diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo y las letras x, y, z indican diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p<0,05)

3.2.2.2. Inoculación de *Pinus pinea*

El ANOVA realizado con los datos de longitud aérea (Tabla XXVI, Apéndice 1) indica que existen diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05), tiempos de muestreo (p<0,01) y en la interacción (p<0,05). La representación de los resultados aparece en la Figura 3.30.

El mayor incremento se detecta de T0 a T1 en todos los casos, siendo más acusado en plantas inoculadas que en las no inoculadas, estableciéndose diferencias significativas entre ambas. El incremento de T1 a T2, no es tan marcado, sin embargo, bajo la influencia de *B. licheniformis*, se alcanzan diferencias significativas con respecto al control y a las inoculadas con *B. pumilus*. Se detecta una aceleración en el crecimiento de las plantas inoculadas con las dos bacterias frente al control.

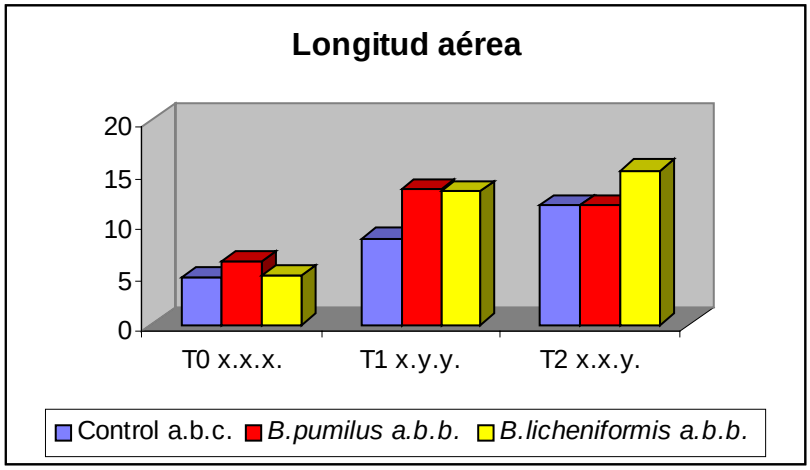


Figura 3.30. Resultados de longitud aérea de las plantas de *P. pinea*, inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Las letras a, b, c indican las diferencias dentro del mismo tratamiento a lo largo del tiempo y las letras x, y, z indican diferencias entre tratamientos en cada tiempo de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p<0,05)

El ANOVA realizado con los datos de superficie aérea (Tabla XXVII, Apéndice 1) revela diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05) y entre tiempos de muestreo (p<0,01) pero no en la interacción. En la Figura 3.31, se observa cómo este parámetro sigue la misma evolución que la longitud aérea, presentando una superficie aérea significativamente mayor las muestras inoculadas.

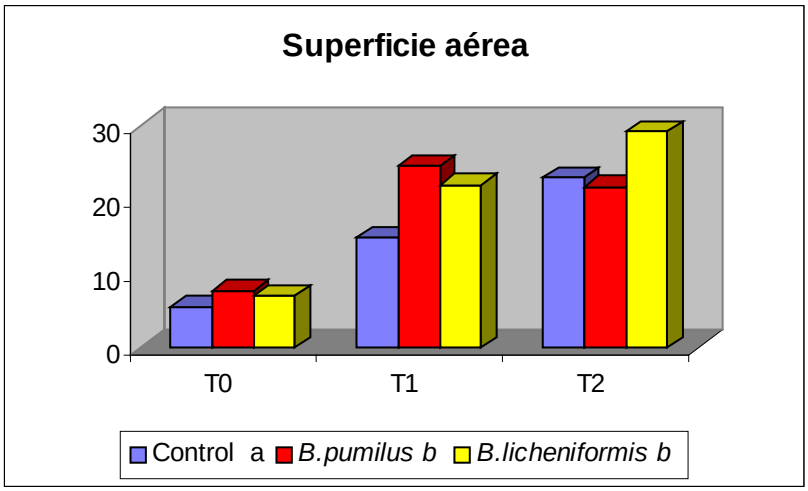


Figura 3.31. Resultados de superficie aérea de plántulas de *P. pinea*, inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Las letras a, b, c indican las diferencias entre tratamientos considerando la media entre tiempos de muestreo; letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p<0,05)

El análisis del sistema radical, longitud (Tabla XXVIII, Apéndice 1) y superficie (Tabla XXIX, Apéndice 1) indica, mediante ANOVA, que existen diferencias significativas (p<0,01)

solamente entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento para ambos parámetros. Los resultados aparecen representados en las Figuras 3.32 y 3.33 respectivamente.

En el crecimiento del sistema radical se detecta un incremento muy marcado de T0 a T1, tanto en las plantas inoculadas como en los controles, mientras que el incremento de T1 a T2 no es tan notable en las inoculadas como en el control. Aunque las diferencias no se observan como significativas, existe un efecto diferencial entre tratamientos. La inoculación con *B. licheniformis* desarrolla un sistema radical más corto y ramificado que la de *B. pumilus*.

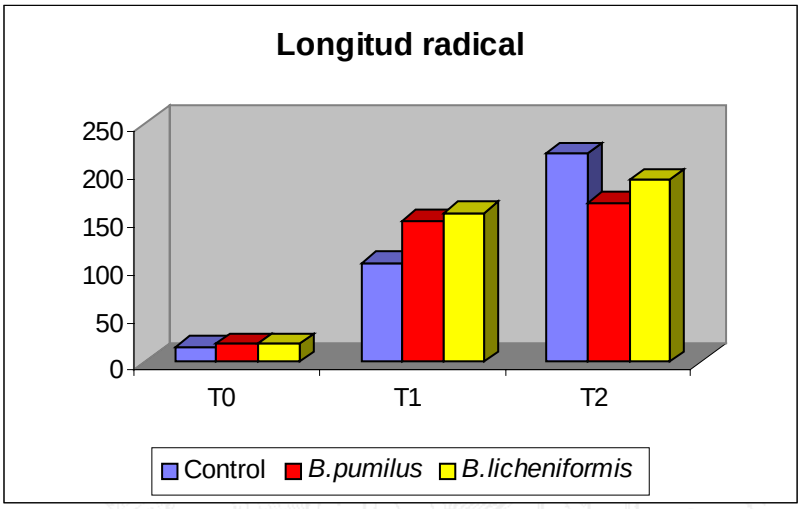


Figura 3.32. Resultados de longitud radical de las plantas de *P. pinea* inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo.

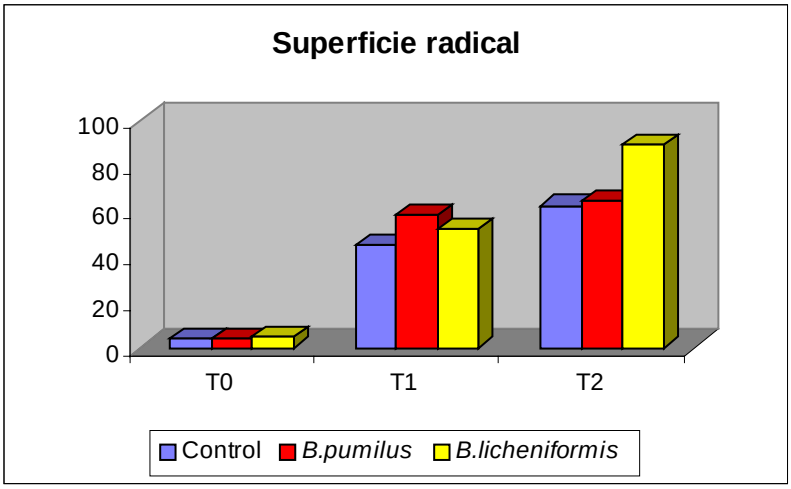


Figura 3.33: Resultados de superficie radical de las plantas (*P. pinea*) inoculadas con *B. pumilus* y *B. licheniformis* y el control en los tres tiempos de muestreo.

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *Alnus glutinosa* (L) GAERTN Y *Pinus pinea* CON *B. pumilus* Y *B. licheniformis*

BIBLIOTECA VIRTUAL

En esta parte de la presente Memoria se ha realizado un estudio del efecto biológico de la inoculación de *A. glutinosa* y *P. pinea* con *B. pumilus* y *B. licheniformis* sobre el crecimiento de ambas especies, su capacidad para colonizar la rizosfera de las plantas, y el efecto sobre la comunidad microbiana edáfica. Estas dos bacterias ya habían demostrado su capacidad para alterar la fisiología de *A. glutinosa* a través de los metabolitos liberados al medio de cultivo en condiciones axénicas (Probanza *et al.*, 1996). La problemática experimental que se plantea en estos trabajos es compleja, pues la forma de establecer la relación entre la cepa, o cepas, objeto del ensayo con la planta es muy variable. Sin embargo, en primer lugar hay que comprobar la potencialidad bacteriana para desencadenar un efecto biológico, perjudicial o beneficioso; y posteriormente, estudiar aspectos como la capacidad de colonización de dichas bacterias sobre el sistema radicular, considerando los problemas de competencia con otros organismos, tipo de inóculo, permanencia en el sustrato edáfico, etc. Como se puede apreciar, son dos aspectos que en sí mismos requieren de estudios complejos y metodologías diferentes, y teniendo en cuenta este aspecto, se planteó el diseño experimental de este trabajo.

Con el fin de demostrar su potencial como PGPRs, se realizan experimentos en condiciones ambientales controladas, en cámara de cultivo, utilizando suelo no estéril, e inoculando directamente en dicho sustrato las cepas mencionadas. En estas condiciones los microorganismos ensayados encuentran un ambiente muy distinto al que encontraron en el medio de cultivo, donde liberaban metabolitos capaces de alterar la fisiología de las plantas.

Son dos las razones fundamentales por las que dichas cepas pueden demostrar un efecto fisiológico indirecto en las condiciones ensayadas previamente por Probanza *et al.* (1996) y, posteriormente, mediante inoculación directa, no manifestar el mismo efecto o mostrar otro diferente. En primer lugar el medio de cultivo en el que crecieron las bacterias es un medio estéril en el que por lo tanto, no tienen que competir con otros microorganismos, aspecto este muy importante dada la gran cantidad de relaciones de competencia que se establecen en el ambiente rizosférico, ya sea por el desarrollo de interacciones alelopáticas (Wei *et al*,, 1991), ya sea por la simple ocupación de nicho (Wiehe y Hoflich, 1995). En segundo lugar, el ambiente rizosférico es muy selectivo debido a que los nutrientes disponibles son los estrictamente liberados por la planta (Whipps, 1990), habiendose demostrado que las características de las mismas son propias del tipo de planta (Zhang *et al.*, 1991) e incluso de su estado fisiológico (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1995; Smith, 1970).

La capacidad de una cepa PGPR para modificar la fisiología de la planta depende en último extremo de su capacidad para sintetizar y liberar al medio moléculas biológicamente activas, lo que en muchas ocasiones depende de la fuente carbonada disponible. En este sentido podemos citar los trabajos de Frankenberger y Poth (1987) que demuestran que la capacidad de *Pisolithus tinctorius* para sintetizar auxinas depende de la disponibilidad de triptofano, lo que

hace que este microorganismo sólo demuestre su efecto sobre plantas capaces de liberar triptofano vía exudación.

En función del objetivo que se pretende alcanzar con una cepa PGPR, varía la valoración de su efecto biológico, tanto en el laboratorio como en condiciones naturales. Actualmente son dos los objetivos prioritarios que se persiguen con el empleo de PGPRs, por una parte la obtención de cepas bacterianas o fúngicas que se pueden incorporar al Manejo Integrado de Plagas (MIP), con la consiguiente reducción del uso de fertilizantes o pesticidas (van Elsas *et al.*, 1998). Por otra parte, la obtención de cepas que permitan un mejor aprovechamiento de la nutrición vegetal, bien induciendo modificaciones del sistema radical (Holl *et al.*, 1988) o bien modificaciones más fisiológicas como la optimización de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Okon e Itzigsohn, 1995). En nuestro caso el estudio del efecto biológico de las cepas inoculadas se dirige fundamentalmente a aspectos morfológicos: desarrollo de la parte aérea y radical. Se persigue que las plantas inoculadas alcancen con mayor rapidez una parte aérea más desarrollada, junto con un sistema radical que permita una mayor capacidad de exploración del sustrato.

Por otra parte se realizan experimentos sobre turba-arena estéril, en condiciones de invernadero, donde participan otros factores que también afectan a la actividad PGPR. En estas condiciones además de ensayar otro sustrato edáfico, se comprueba la actividad promotora del crecimiento sobre otra especie distinta a la de origen, por lo que los experimentos de invernadero se realizan sobre *A. glutinosa* y *P. pinea*. Esta última se selecciona por ser otra planta leñosa, con un gran interés en las actuales prácticas de reforestación. Según distintos autores, la rizosfera es un medio muy selectivo, donde la diversidad es menor que en el suelo libre (Marilley *et al.*, 1998). La selección de cepas bacterianas a nivel rizosférico parece determinada por factores genéticos (Chanway *et al*., 1988a; Chanway *et al*., 1988b; Sumner, 1990), que condicionan un especificidad, resultado de una coadaptación evolutiva (Chanway y Nelson, 1991). Parece ser que la capacidad de colonización de una bacteria está fuertemente condicionada por la mencionada capacidad de selección de la planta; cabe destacar en este sentido los trabajos de (Chanway *et al*., 1988a; Chanway *et al*., 1988b) en los que detectan una relación entre el origen de la bacteria inoculada y su capacidad para colonizar durante un tiempo determinado la rizosfera de la planta.

Actualmente se considera que la capacidad de una PGPR para ejercer su efecto pasa necesariamente por la colonización de la raiz (Wiehe y Hoflich, 1995), durante un tiempo variable en función del mecanismo por el cual la bacteria ejerce su efecto. Este aspecto es ampliamente discutido, ya que la no detección de las cepas ensayadas puede no ser significativa en cuanto a la existencia o no de efecto biológico, según la metodología que se emplee. Podemos no detectar la presencia de las bacterias debido a los errores experimentales y/o sensibilidad del método, y sin embargo, apreciar efecto biológico.

El análisis de la evolución del inóculo en la rizosfera se puede realizar por diversos métodos. Uno de los más utilizados es el recuento en placa de las cepas inoculadas en las que previamente se ha inducido alguna resistencia a antibióticos (Wiehe y Hoflich, 1995). Este carácter, junto con otras características morfológicas o bioquímicas pueden ayudar a seguir la supervivencia del inóculo (Bent y Chanway, 1998). Sin embargo, nuestra experiencia nos ha demostrado que el método está sometido a considerables errores debido a la enorme variabilidad de las cepas bacterianas que se desarrollan en el ambiente edáfico, vaiabilidad que se traduce en la fácil aparición de resistentes al antibiótico. Otro método es el empleo de técnicas moleculares, en este sentido podemos decir que existen técnicas moleculares (van Elsas *et al.*, 1998) con un poder de resolución mucho mayor para la identificación de bacterias a nivel de cepa, diferenciando con facilidad cepas de la misma especie. Estos métodos tienen la ventaja de ser mucho más exactos en apreciaciones cuantitativas, pero también presentan inconvenientes, fundamentalmente al tratarse de métodos tan selectivos y específicos pueden cometerse errores de infravaloración de la población, ya que se depende de la viabilidad de la bacteria en el medio de cultivo. Además la bacteria inoculada puede provocar alteraciones generales de la comunidad microbiana, indetectables por las técnicas mencionadas, de forma que los efectos observados sean la consecuencia de dichas alteraciones más que de la propia cepa inoculada.

En este trabajo se ha optado por el empleo de una técnica que permite detectar las alteraciones globales de la comunidad microbiana: análisis del perfil de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos de membrana (PLFAs) (Tunlid y White, 1991; Fostergard *et al.*, 1997). Esta técnica es ampliamente empleada en estudios de las comunidades microbianas a nivel edáfico (Steinberger *et al.*, 1999) y tiene dos ventajas fundamentales:

1. Se pueden realizar análisis de las comunidades microbianas viables y no viables, ya que la extracción de PLFAs se puede realizar tanto de las bacterias extraídas del suelo y de aquellas que crecen en la placa, lo que perminte evaluar la capacidad de colonización del inóculo independientemente de la supervivencia de la bacteria en la placa de cultivo.

2. Nos permite concluir si el inóculo ha producido cambios globales en el sistema, por lo tanto, no sólo si el inóculo persiste, sino también si la comunidad bacteriana sufre una alteración esencial a corto o largo plazo como consecuencia de la introducción del inóculo.

En base a la primera de las dos ventajas descritas, el análisis del perfil de PLFAs se hace por duplicado, haciendo una extracción de ácidos grasos directamente de una suspensión del suelo rizosférico (PLFAs de suelo) y otra extracción de las cepas bacterianas crecidas en placa, procedentes de esta misma suspensión (PLFAs de placa). De esta forma dispondremos de información complementaria, mientras el primer análisis (PLFAs de suelo) incluye a la problación rizosférica total (viable y no viable, cultivable y no cultivable), el análisis de PLFAs de placa refleja la evolución de las bacterias viables y cultivables.

Con esta metodología y mediante el análisis de la población rizosférica total por una parte, y viable-cultivable por otra conseguimos amortiguar las dificultades del estudio de la rizosfera por los métodos clásicos utilizados de rutina en los estudios de microbiología del suelo, ya que se estima que solamente entre un 0,3 % y un 20 % de las bacterias del suelo libre son cultivables (Alexander, 1977; Torsvik *et al.*, l991) mientras que sólo entre el 1 y el 10 % de las rizosféricas son cultivables (Campbel y Greaves, 1990). Por otra parte, con esta metodología podemos estudiar la evolución de las poblaciones bacterianas en conjunto a corto y largo plazo, asumiendo que es una muestra representativa de la comunidad microbiana total (Wagner *et al.*, 1993).

Con este estudio podemos obtener la información necesaria para afrontar una de las etapas obligadas en el futuro uso comercial de inoculantes biológicos en campo, que es abordar el previsible comportamiento de la población bacteriana introducida en un sistema edáfico determinado, donde establecerá relaciones de competencia con otros microorganismos así como la interacción con la planta (Gilbert *et al.*, 1993). Al abordar este estudio se ha tenido en cuenta que uno de los factores que más condicionan la composición rizobacteriana es la planta a través de los exudados (Newman, 1985). Hay que tener en cuenta que la rizosfera es un medio especialmente rico en nutrientes, que proceden principalmente de los exudados liberados al medio por la planta, proceso que además resulta estimulado por las rizobacterias al actuar como sumidero (Meharg y Killham, 1991). El perfil de PLFAs variará drásticamente dependiendo, entre otros factores, de la planta, que determina el sistema rizosférico en interacción con el tipo de suelo que sirve como sustrato (Whipps, 1990).

Los resultados obtenidos en el análisis de PLFAs procedentes de la rizosfera de *A. glutinosa*, se ordenan mediante ACP en cada caso, es decir para cada bacteria (*B. pumilus* y *B. licheniformis*) y su control no inoculado, en cada suelo (A y B), y dependiendo de si se han extraído de suelo o de placa. Este método de análisis multivariante nos permite evaluar la similitud de los perfiles de PLFAs y por lo tanto, la similitud de las comunidades estudiadas. El ACP es en definitiva un método de ordenación ampliamente utilizado en el estudio de las comunidades microbianas (Steinberger *et al.*, 1999; Baath *et al.*, 1995).

La primera ordenación del análisis de PLFAs se realiza dividiendo los resultados en dos grandes grupos, los obtenidos de la inoculación con *B. pumilus* y los obtenidos de la inoculación con *B. licheniformis*. Por lo tanto se analizan simultaneamente los datos procedentes de los suelos A y B en los distintos tiempos de muestreo. Los ACPs muestran dos hechos claramente definidos:

- Cuando los análisis de componentes principales se realizan con los datos de PLFAs obtenidos de la extracción directa de suelo, la ordenación se define fundamentalmente según el suelo utilizado como sustrato para el crecimiento de las plantas (Figuras 3.9 y 3.11)

- Cuando los análisis de componentes principales se realizan con los datos de PLFAs extraidos de las bacterias cultivables (PLFAs de placa), la ordenación se altera considerablemente y las muestras tienden a agruparse según el momento de muestreo, sobre todo en el caso de la inoculación con *B. pumilus* (Figura 3.2) o según las muestras estuvieran o no inoculadas, en el caso de *B. licheniformis* (Figura 3.4). En cualquier caso, y aunque dentro de cada agrupación se pudieran detectar subgrupos según el suelo de origen, éste deja de ser el factor determinante en la ordenación de las muestras.

La composición de PLFAs de las membranas bacterianas depende en gran parte de los sustratos disponibles (Baath *et al.*, 1995). Esta es una de las razones fundamentales por las que se pueden discriminar mediante análisis de PLFAs suelos de distinta naturaleza (Steinberger *et al.*, 1999). Parece claro que el factor edáfico es determinante cuando la extracción de ácidos grasos se hace directamente del suelo (Figuras 3.1 y 3.3); la separación de las muestras es muy acusada, reflejando las marcadas diferencias fisicoquímicas entre ambos suelos (Material y Métodos apartado 2.1.2). En el análisis de PLFAs de suelo inoculados con *B. pumilus*, asumiendo las generalizaciones que se pueden hacer en cuanto a los ácidos grasos característicos de una población bacteriana (Petersen y Klug, 1994), si analizamos los factores de carga de las variables (Tabla 3.II) que definen la ordenación de acuerdo con los criterios seguidos por Steinberger *et al.*, (1999), podemos afirmar que la comunidad microbiana total de los suelos A y B, es predominantemente gram negativa, ya que en ambos casos, los ácidos grasos monoinsaturados (17:1ω8, 18:1 y 19:1b), tienen una fuerte influencia en la separación de las muestras. No obstante, también se aprecia una población gram positiva, representada por el elevado peso de los ácidos grasos cy17 y cy 19, si bien en otros trabajos, estos ácidos grasos también se ha atribuido a gram negativas (Wilkinson ,1988). La presencia de organismos eucariotas en el suelo B se pone de manifiesto por la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados 18:2ω6 y 20:4, que tienen una fuerte influencia en la separación de estas muestras. En cuanto al análisis correspondiente a los PLFAs de suelo de la inoculación con *B. lichenformis* (Figura 3.3), podemos afirmar que el suelo A tiene una composición más variada que el suelo B, ya que los factores de carga (Tabla 3.IV) que más influencia tienen en la separación de las muestras del suelo A del B sobre el eje II, son el br18:0, característico de gram positivas, el 16:1ω5, de gram negativas y el ácido graso poliinsaturado 20:4, característico de eucariotas. Merece la pena resaltar la fuerte influencia de los ácidos grasos 17:0, 19:1b, 20:4, 17:1ω8, 18:1, cy17 y cy 19 en todas las ordenaciones del análisis de PLFAs extraídos directamente de suelos rizosféricos.

En análisis posteriores en los que se consideran los suelos por separado (Figuras 3.5, 3.7, 3.9 y 3.11), la variación en la composición de los PLFAs permite discriminar con claridad entre tiempos de muestreo y entre muestras inoculadas y no inoculadas. Estos resultados

demuestran que las variaciones en los perfiles de PLFAs debidas al tipo de suelo absorben apreciablemente más varianza que las variaciones en los perfiles de PLFAs inducidos por las inoculaciones, tanto con *B. pumilus* como con *B. licheniformis*.

Cuando la extracción de PLFAs se realiza a partir de las cepas cultivables, la fuente de nutrientes es común para todas las cepas durante un tiempo suficiente como para que las diferencias debidas al sustrato pasen a no ser determinantes de la ordenación, cobrando importancia las variaciones debidas a la inoculación y al tiempo transcurrido desde ésta. Así, los ácidos grasos característicos en estos análisis son distintos de los encontrados en los PLFAs de suelo. En la Figura 3.2 aparece representado el ACP realizado con los PLFAs extraidos de bacterias rizosféricas cultivables en placa, procedentes de plántulas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B; los factores de carga (Tabla 3.IV) que más influyen en la separación son los ácidos grasos ramificados Me16, i17 y a17, característicos de gram positivas, aunque también aparecen algunos monoinsaturados, con menor incidencia en la ordenación de las muestras, característicos de gram negativas (18:1ω7 y 16:1ω9). Esta situación se repite en el ACP realizado para *B. licheniformis*, en el que los factores de carga (Tabla 3.VIII) que más influencia tienen son de nuevo característicos de gram positivas (i16:0, i17, Me 16, Me18), negativas (17:1ω8 y 16:1ω9) e incluso de eucariotas (20:4, 18:2ω6). Como en el caso de los análisis de PLFAs de suelo, podemos resaltar la fuerte influencia de los ácidos grasos Me18, 16:1ω9 e i17 en la ordenación de las muestras de PLFAs de placa. El hecho de que la divergencia entre las muestras control e inoculadas en T0 se detecte tanto en el análisis de los PLFAs de suelo como de placa, así como la influencia de ácidos grasos indicadores de gram positivas, indican la fuerte presencia del inóculo en la rizosfera tras la inoculación y la eficacia del método analítico para mostrar la presencia de ambas cepas de *Bacillus*, en los análisis de bacterias viables y cultivables

Como ya se comentó anteriormente, uno de los cambios fundamentales que se aprecia al analizar la microflora total y la viable-cultivable, es la pérdida de peso del factor suelo en la ordenación de las muestras. Este aspecto es muy significativo de la importancia del suelo en el que se realiza la inoculación. Análisis posteriores demuestran que cada suelo debe ser objeto de estudio por separado y que la eficacia biológica de una inoculación no sólo es dependiente de la planta sino también del sustrato en el que se desarrolla.

La inoculación con *B. licheniformis* se muestra en este sentido, menos agresiva, y esto podemos deducirlo de los resultados expuestos en las Figuras 3.2 y 3.4, en las que se puede apreciar cómo la inoculación con *B. licheniformis* (Figura 3.5), permite definir aún una separación de las muestras inoculadas procedentes del suelo A o B, mientras que en la inoculacion con *B. pumilus* (Figura 3.2) se aprecia la separación de las muestras por tiempos de muestreo, perdiendose totalmente la influencia del suelo y del factor biótico (inóculo). Por otra parte podemos apreciar como en el caso de *B. licheniformis*, las muestras procedentes del suelo

A inoculadas y no inoculadas se agrupan, mientras que en el suelo B se aprecia una dispersión de las muestras control con respecto a las inoculadas. Esto indica que la inoculación de *B. licheniformis* provoca una menor alteración de las comunidades microbianas cultivables en el suelo A, probablemente debido a la presencia de esta cepa en su suelo de origen.

Los resultados del análisis de PLFAs de suelo extraídos de la rizosfera de plántulas inoculadas y no inoculadas crecidas en el suelo A (Figuras 3.5 y 3.7), indican con claridad la presencia del inóculo a las 24 h de la inoculación (T0) y su persistencia a las dos semanas (T1). Las muestras inoculadas se separan de sus controles no inoculados, aproximándose a medida que transcurre el tiempo, lo que indica que la estructura de la población rizosférica total no se ve afectada a largo plazo por la inoculación, ya que tanto en el caso de *B. pumilus* como en el de *B. licheniformis* a las ocho semanas del comienzo del experimento, el perfil de PLFAs de plántulas inoculadas se asemeja mucho al de las no inoculadas. Estos resultados corroboran el fuerte control que ejerce la planta sobre la composición de la rizosfera, ya descrito por otros autores (Gilbert *et al.*, 1993), aunque no podemos descartar la capacidad del suelo A y de las comunidades microbianas que se desarrollan en éste para amortiguar el efecto que la inoculación tiene sobre el equilibrio del sistema, hecho razonable ya que, como se ha comentado antes, es el propio suelo de origen de las cepas ensayadas.

Sin embargo, la evolución de la población rizosférica de los microorganismos viables y cultivables en placa es diferente en las plantas inoculadas y no inoculadas (Figuras 3.6 y 3.8) con ambos tratamientos (*B. pumilus* y *B. licheniformis*) se detecta la divergencia entre las muestras inoculadas y no inoculadas a las 24 horas (T0), reflejando con claridad la fuerte alteración del perfil de PLFAs, y por lo tanto, la presencia del inóculo sobre la estructura de la comunidad microbiana. Sin embargo, las muestras inoculadas permanecen próximas en los demás tiempos de muestreo mientras que las no inoculadas se dispersan. A esto no referimos cuando señalamos la diferente evolución de las poblaciones. Estos resultados sugieren, por una parte, que la población inoculada se establece en la rizosfera de la planta durante todo el periodo experimental. Por otra parte, se puede apreciar, que aunque el efecto de la inoculación no altera significativamente la estructura de la comunidad microbiana total (Figs. 3.6 y 3.8), si se producen considerables alteraciones en la comunidad viable y cultivable, que sólo se observan cuando se analizan por separado. Cabe destacar la divergencia entre las muestras inoculadas y las controles al final del experimento.

En el suelo B, más pobre, la estructura de la población rizosférica varía de distinta manera con respecto al suelo A. El análisis de los PLFAs extraídos directamente de suelo rizosférico inoculado con *B. pumilus* y *B. licheniformis* (Figuras 3.9 y 3.11, respectivamente), refleja una divergencia en la estuctura de la comunidad rizobacteriana de las plántulas inoculadas y no inoculadas, aspecto que se aprecia de forma distinta en cada caso. Con *B. pumilus* se observa una agrupación de las muestras controles e inoculadas durante los primeros

15 días, para finalmente separarse las inoculadas a las 6 y 8 semanas. Sin embargo, *B. licheniformis* provoca una alteración a las 24 h, y una separación definitiva entre las muestras inoculadas y no inoculadas. Por tanto, una inoculación en un suelo más pobre y distinto al de origen de las bacterias provoca en una fuerte alteración de la estructura rizobacteriana en el tiempo.

Al analizar las poblaciones viables y cultivables apreciamos efectos diferentes según el inóculo. En el caso de *B. pumilus* (Fig. 3.11) la separación de las muestras en T0 refleja la inoculación, confluyendo las muestras control e inoculadas desde las 6 semanas, lo que indica la desaparición del inóculo. En el caso de *B. licheniformis* (Fig 3.12) se aprecia un efecto semejante al observado en el suelo A, en el que las muestras inoculadas evolucionan de forma diferente a las no inoculadas. Sin embargo se aprecia finalmente una similitud entre las muestras inoculadas y no inoculadas, lo que indica una menor permanencia del inóculo en este suelo.

Una vez discutidos los aspectos relativos a la inoculación, supervivencia del inóculo y alteraciones en la estructura de la comunuidad microbiana, pasamos a analizar su relación con las alteraciones en el crecimiento de las plantas.

En el suelo A, los efectos sobre el sistema aéreo empiezan a detectarse a las seis semanas de la inoculación (T2), alcanzandose valores significativamente mayores en la longitud (Figura 3.14) y superficie aérea (Figura 3.13) de las plántulas inoculadas; en este caso, *B. pumilus* resulta más efectivo que *B.lichenformis*.

Por otra parte, el análisis de los parámetros radicales evaluados refleja una aceleración del crecimiento en superficie (Figura 3.15) y en longitud (Figura 3.16) de las plantas inoculadas. En el caso de la longitud radical, el incremento de T1 a T2 es acusado, mientras que en las no inoculadas el incremento más importante ocurre de T2 a T3, cuando se alcanzan valores similares en todos los casos, es decir, las diferencias entre plantas inoculadas y los controles o son significativos al final del experimento. Esta aceleración detectada a las seis semanas de la inoculación puede conferir a la planta una gran ventaja a la hora de establecerse con éxito en una reforestación, hecho ya descrito por otros autores, que afirman que las ventajas de la inoculación de plantas para reforestación con PGPRs se adquieren en los primeros momentos del establecimiento de la plántula (Chanway, 1997), a pesar de la posterior sustitución de la bacteria inoculada por la microflora autóctona. También se detecta una aceleración del crecimiento en la superficie radical de plantas inoculadas en T2, pero en este caso la influencia de *B. licheniformis* determina un incremento significativamente mayor, que *B. pumilus* y que el control. Al final del experimento la superficie radical de las plantas inoculadas es significativamente mayor que en las control. Esto se traduce en un sistema radical más ramificado y con mayor superficie de contacto con el sustrato que el de las plantas no inoculadas. El hecho de que el parámetro más afectado sea la superficie radical apunta a la producción de hormonas de tipo auxínico como uno de los mecanismos de acción utilizados por

las bacterias PGPR (Holl *et al.*, 1988), ya descrito por Gutiérrez Mañero *et al.*, (1996) en estas bacterias. Como ya se indicó anteriormente, las variaciones en la longitud y superficie radical son buenos indicadores de la presencia de hormonas (Chandwick y Burg, 1987; Selvadurai *et al.*, 1991). El mayor efecto de *B. licheniformis* puede indicar una mayor producción de hormonas de este tipo o al menos diferente (datos sin publicar HPLC).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio de la parte aérea no pueden justificarse por la producción de hormonas de tipo auxina a este nivel. El efecto auxínico inducido por las bacterias inoculadas afecta directamente en el sistema radical (Selvadurai *et al.*, 1991), y este efecto puede determinar una mejora en la capacidad de nutrición de la planta al aumentar su superficie de contacto con el sustrato. Germida y Walley (1996) sugieren que las PGPRs tienen una gran influencia sobre el patrón de crecimiento radical y en consecuencia, alteran la capacidad de captación de nutrientes y agua, lo que afecta decisivamente al crecimiento de la planta.

Una mejora en la capacidad de nutrición de la planta puede ser la causa de una estimulación en el desarrollo del sistema aéreo y por lo tanto de la productividad primaria. Sin embargo, el efecto observado ocurre con una intensidad apreciable en un espacio de tiempo demasiado corto como para ser atribuible en exclusiva a una mejora en la nutrición de la planta. Estos resultados sugieren por lo tanto que las bacterias inoculadas producen hormonas que ejercen su acción al nivel aéreo, tras su translocación a esta zona. Todo parece indicar que los compuestos responsables del efecto son hormonas del tipo giberelina, por lo que se abordó el estudio de producción de las mismas en un capítulo posterior de la presente Memoria.

En el suelo B, no se detectan diferencias significativas en los parámetros aéreos (Figuras 3.17 y 3.18) entre las plantas inoculadas y no inoculadas. No obstante, resulta interesante destacar que bajo la influencia de *B. licheniformis* se observa un incremento apreciable en la longitud aérea de T2 a T3 con respecto al control. Por tanto, podemos hablar de un efecto biológico de esta cepa sobre el crecimiento. Hablamos de efecto biológico ya que se detecta la presencia de la bacteria en el sistema rizosférico pero sí hay alteraciones en el crecimiento de la planta, como veremos más adelante sobre todo a nivel del sistema radical, pero dicho efecto no se ha traducido en un incremento significativo de la parte aérea.

En cuanto al estudio de los parámetros radicales, ambos tratamientos (*B. pumilus* y *B.lichenformis*) resultan efectivos en el estímulo de la superficie radical (Figura 3.19), siendo *B. licheniformis* más efectivo que *B. pumilus* con respecto a su control. Además, *B. licheniformis* también determina un incremento significativo de la longitud radical (Figura 3.20) al final del experimento mientras que *B. pumilus* sólo demuestra este efecto a las 6 semanas (T2), perdiéndose en T3. Estos resultados apuntan de nuevo a la producción de auxinas como mecanismo de actuación, aunque en este caso no se detecta un efecto claramente diferencial entre ambos tratamientos.

El apreciable efecto de la inoculación sobre el desarrollo del sistema radical, al no ir acompañado de un claro efecto biológico sobre el desarrollo de la parte aérea, implica que en el suelo B, o bien las bacterias inoculadas no son capaces de producir hormonas de tipo giberelina como se sugiere en el suelo A, o bien el desarrollo del sistema radical no se materializa en una mejora de la nutrición de la planta debido a la escasez de nutrientes en este suelo. De cualquier forma, el efecto de la inoculación en el suelo B es menos evidente que en el suelo A. Como ya se comentó anteriormente, la relación entre la colonización del sistema radical y el efecto biológico es ampliamente discutida por numerosos autores, Reddy y Rahe, (1989) demuestran que no es necesario un población muy abundante para ejercer el efecto estimulador del crecimiento y Holl y Chanway (1992) proponen que una respuesta estimuladora del crecimiento puede ser provocada por una población bacteriana poco abundante, aunque necesita un mínimo (población umbral).

En nuestro caso existe una clara relación entre el efecto biológico y la alteración de la comunidad microbiana viable de las muestras inoculadas en suelo A, sin embargo, en el suelo B, la alteración de la comunidad microbiana viable desaparece en el tiempo y también el efecto biológico es menor, a pesar de la fuerte y duradera alteración provocada en la comunidad rizobacteriana total (viable y no viable), que, en consecuencia, no se debe a la presencia de las bacterias inoculadas. Por lo tanto, el estudio de la colonización mediante el análisis del perfil de PLFAs demuestra coherencia entre la persitencia y eficacia de la colonización y su efecto biológico sobre el crecimiento de las plantas. Entre los factores descritos hasta la fecha que determinan una buena colonización, se pueden señalar el fuerte condicionante que supone el aporte de exudados y la tasa de utilización de éstos en la competencia con otros microorganismos (Jjemba y Alexander, 1998) así como una buena adherencia a la superficie radical en el momento de la inoculación. Citamos estos factores por ser los que se pueden ver afectados en mayor medida por el cambio de suelo, aunque, según estos mismos autores, la predación por protozoos y la capacidad de la bacteria de mantener una población alta en la rizosfera son otros factores que no se pueden descartar.

En líneas generales, una vez relacionado el estudio de la inoculación de la rizosfera de *Alnus glutinosa* mediante el análisis de PLFAs con el efecto biológico de la misma, podemos señalar que en el suelo A, tanto *B. pumilus* como *B.lichenformis* muestran un mayor efecto biológico que en el suelo B. Por otra parte, *B.lichenformis* resulta más efectivo que *B. pumilus* excepto en la parte aérea de las plantas crecidas en el suelo A, donde *B. pumilus* es más eficaz. Podemos indicar que *B. pumilus* pierde capacidad de colonización y actividad sobre en el desarrollo de la planta al variar el sustrato donde se inocula la bacteria, es decir, al inocularla en un suelo distinto al suelo A, del que fue aislada. Además mientras que en el suelo A compite eficazmente con los microorganismos autóctonos, estableciendo una población detectable según los análisis de PLFAs de placa (Figura 3.8), en el suelo B, no es capaz de competir con éxito,

desapareciendo a las 2 semanas de la inoculación (PLFAs de placa, Figura 3.10), tras causar una alteración en la estructura de las comunidades rizosféricas (PLFAs de suelo, Figura 3.9).

Estos resultados sugieren una menor competitividad de *B. pumilus*, que puede ser consecuencia de un nivel mayor de exigencia en sus requerimientos nutricionales, aspecto que puede abarcar desde los sustratos empleados desde un punto de vista energético, a sustratos que se utilicen más específicamente en rutas metabólicas secundarias, pero vitales para la bacteria. Esto habla de una mayor especificidad de esta cepa, cuyo efecto viene fuertemente condicionado por el sustrato, lo que la transforma en una PGPR potencialmente de menor calidad.

Como ya se comentó anteriormente en el diseño del experimento, el siguiente paso en el estudio de la aplicación de bacterias PGPRs es testarlas sobre otras especies arbóreas con el objeto de comprobar si la especificidad en el efecto promotor del crecimiento está o no condicionada por la planta de origen. Mientras que el estudio de las PGPRs en plantas de interés agrícola se encuentra actualmente en plena fase de expansión, son escasos los estudios realizados en plantas forestales aún a pesar de su enorme potencial en la mejora y sostenibilidad de recursos. Es imprescindible pasar por los ensayos de inoculaciones cruzadas en condiciones controladas ya que puede existir cierta especificidad en la respuesta de la planta a la bacteria inoculada, dependiendo de la especie vegetal (O'Neill *et al.*, 1992; Chanway y Holl, 1993), que puede verse afectada por condiciones ambientales locales y geográficas (Enebak *et al.*, 1998).

Con este objetivo, y dado que no se puede descartar la influencia del sustrato en el efecto promotor del crecimiento, como ya hemos visto en condiciones controladas de laboratorio, se inocularon plántulas de *Pinus pinea* y de *A. glutinosa* crecidas sobre otro soporte diferente y común a ambas, turba arena (1/1, v/v), estéril, estudiando la capacidad de colonización de las bacterias en ambas especies, y la producción primaria mediante medidas biométricas, en los tiempos de muestreo definidos según se describió en el Apartado 2.2 de Materiales y Métodos.

Los análisis del perfil de PLFAs extraídos directamente de la rizosfera de plántulas de aliso, crecidas sobre turba arena, no inoculadas e inoculadas con *B. pumilus* (Figura 3.21) o *B. licheniformis* (Figura 3.23), así como el perfil de PLFAs de placa (Figuras 3.22 y 3.24, respectivamente), reflejan la divergencia de las muestras después de las inoculaciones, salvo en el caso de PLFAs de suelo extraídos de la rizosfera de plantas inoculadas con *B. pumilus*, en el que no se aprecia la primera inoculación. A los dos meses (T2), el perfil de las bacterias viables y cultivables se asemeja mucho al de totales, indicando que el inóculo desaparece a lo largo del tiempo. Es muy importante señalar que estos experimentos se han realizado con un sustrato común para ambas plantas, esterilizándolo previamente, con el objeto de eliminar los fenómenos de competencia que, a priori, pueden alterar la eficacia de la inoculación. Esta práctica es solamente realizable en condiciones de invernadero. Los resultados obtenidos en el

análisis de PLFAs totales (Figuras 3.21 y 3.23), y de PLFAs de placa (3.22 y 3.24) confirman la hipótesis de la importancia de los procesos de competencia en el establecimiento de los inoculantes ya que al eliminar la población microbiana mediante esterilización, se observa un comportamiento muy semejante en la distribución de las muestras en todos los casos, ya que la población viable y cultivable constituye prácticamente la población total.

El análisis del perfil de PLFAs extraídos de las bacterias cultivables en placa, procedentes de la rizosfera de plántulas de pino inoculadas y no inoculadas (Figura 3.25), refleja la divergencia de las muestras tras la inoculación, y su posterior confluencia en T2. Esto confirma el comportamiento del inóculo tanto de *B. pumilus* como de *B. licheniformis*, que desaparece de la rizosfera a lo largo del tiempo. En este caso, teniendo en cuenta que no existen competencias con otros microorganismos, ya que se han eliminado por esterilización, la desaparición del inóculo puede venir dada por el lavado con agua de riego, ya que ocurre de forma más patente en el caso de *P. pinea*, cuyo aparato radical es pivotante, ofreciendo menos soporte de adherencia a las bacterias que en el caso de *A. glutinosa*, cuyo aparato radical es más ramificado desde los primeros momentos del desarrollo.

El estudio de los parámetros biométricos confirma que la bacteria inoculada es capaz de actuar sobre el crecimiento de la planta también en este sustrato. En el caso del aliso, es *B. licheniformis* el tratamiento que resulta más efectivo, alcanzando valores de superficie aérea (Figura 3.27) y radical (Figura 3.29) significativamente mayores que *B. pumilus* y que el control. La longitud aérea (Figura 3.26) se ve afectada pero no de forma significativa, y la longitud radical (Figura 3.28) no se ve afectada bajo ningún tratamiento. En el caso del pino, también es *B. licheniformis* el que resulta más efectivo, alcanzándose valores de longitud aérea (Figura 3.30) significativamente mayores que bajo la influencia de *B. pumilus* o el control. En el caso de la superfice aérea (Figura 3.31) y radical (Figura 3.33) se detecta un incremento, que es significativo sólo en el primer caso, bajo la influencia de *B. licheniformis*, mientras que en la longitud radical (Figura 3.32) no se ve afectada por ningún tratamiento. Esta evolución de la longitud y superficie radical en ambas plantas puede deberse no sólo al efecto hormonal sino también a que exista una limitación de espacio para el desarrollo en longitud del aparato radical, lo que se evidencia con mayor claridad en el caso de *P. pinea*, planta que como ya se ha indicado, posee un sistema de raíz pivotante que encuentra serias limitaciones para su crecimiento por el tamaño del recipiente entre las 4 y 8 semanas. Como ya se ha mencionado en el caso del aliso, esta alteración de sistema radical puede suponer una ventaja en la adaptación al medio en el campo, ya que un aparato radical mejor desarrollado implica una mejor nutrición, y por tanto, una mejora en la producción primaria. Además debemos considerar un aspecto que, a priori, desde un punto de vista fisiológico carece de importancia, pero que desde el punto de vista de manejo forestal resulta extraordinariamente importante, y es la compactación del sistema radical en el recipiente, lo que facilita el manejo de la planta durante el proceso de

reforestación. No obstante hay que tener en cuenta el efecto negativo que puede tener una etapa de vivero demasiado larga en un recipiente demasiado pequeño para la planta en lo que respecta a la pérdida de dominancia de la raíz, que incide apreciablemente en el porcentaje de marras. Por lo tanto, resulta vital obtener un sistema radical bien desarrollado, con elevada superficie de contacto con el sustrato, en el menor tiempo posible para evitar esta pérdida de dominancia de la raíz principal.

Es importante destacar el efecto que demuestran ambas cepas sobre todos los parámetros estudiados hasta las 4 semanas en *P. pinea*, salvando las limitaciones impuestas por el recipiente. Además, considerando los valores obtenidos a lo largo de todo el experimento, el ANOVA también demuestra diferencias significativas entre las plantas tratadas con *B.lichenformis* con respecto a los controles. De nuevo esta cepa demuestra mayor eficacia con respecto a *B. pumilus*, y lo que además es más importante, demuestra capacidad para estimular el crecimiento de una especie diferente a aquella de la que procede.

En base a los resultados obtenidos en los experimentos realizados con los suelos A y B, en los que considerabamos las 2 fuentes de variación (competitividad del inóculo y efecto del sustrato), con respecto a los experimentos realizados fijando esta última variable (sustrato), y eliminando la primera al esterilizarlo, podemos deducir que el efecto del sustrato, probablemente a través de la disponibilidad de nutrientes, es un factor determinante en la capacidad de colonización y el consiguiente efecto biológico, con respecto a los fenómenos de competencia que se producen en suelos no estériles.

5. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLOGICO DE LA INOCULACIÓN DE *A. glutinosa* CON *B. pumilus* Y *B. licheniformis* SOBRE LA EXUDACIÓN RADICAL Y SOBRE CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SISTEMA RIZOSFÉRICO

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

5.1. Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en los suelos A y B

Se analizaron los 2 suelos utilizados, aliseda (suelo A) y parcela (suelo B), en los 4 tiempos de muestreo determinados, en el momento de la inoculación (T0), a las 2 semanas (T1), a las 6 semanas de la inoculación (T2) y a las 8 semanas de ésta (T3). Todos los análisis se realizaron tanto en la rizosfera de plántulas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* como en la rizosfera de plántulas no inoculadas (control). Se realizaron los siguientes análisis físicoquímicos: pH, amonio, nitrato, nitrógeno total, carbono orgánico y capacidad de intercambio cationico (CIC) en los 4 tiempos de muestreo. Los resultados se exponen en las Tablas 5.1 y 5.2 como la media de los 4 tiempos de muestreo para cada tratamiento y el control.

.

5.1.1. Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en suelo A

Los resultados del análisis de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en suelo A aparecen en la Tabla 5.I. En esta Tabla se expone la significación de las diferencias según el LSD, en aquellos casos en los que el ANOVA realizado fuera significativo (Tablas de la I a la VI, Apéndice 2), según se describe en el Apartado 2.3.4.1 de Materiales y Métodos.

Tabla 5.I. Resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica de los suelos rizosféricos procedentes de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas crecidas en el suelo A. Cada valor es la media de 12 réplicas por tratamiento. El error estándar aparece en cursiva. Las letras a, b, c indican la significación de las diferencias según el LSD; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

	pH	NH_4^+ µg/ g suelo	NO_3^- µg/ g suelo	N total µg/ g suelo	C orgánico %	CIC meq/100g suelo
Control	5,59±*0,28* a	0,75±*0,10* a	9,22±*2,40* a	4,30±*0,43* a	7,18±*0,48* a	39,91±*3,41* a
B. pumilus	5,67±*0,28* b	0,66±*0,15* b	7,48±*2,07* b	4,80±*0,73* b	6,56±*0,83* b	43,87±*2,81* b
B. licheniformis	5,50±*0,09* c	0,55±*0,24* c	7,46±*1,90* b	4,85±*0,32* b	6,81±*0,40* b	36,60±*1,19* c

El pH del suelo rizosférico es ácido en todos los casos, hecho ligeramente más acusado bajo el efecto de *B.licheniformis*.

En la rizosfera de las plantas control las concentraciones de amonio presentan unos valores medios de 0,75 ppm, sin embargo, bajo la influencia de ambos tratamientos se aprecian significativas disminuciones de la concentración de amonio, especialmente bajo la influencia de *B. licheniformis*. También las concentraciones de nitrato disminuyen significativamente con ambos tratamientos, no detectándose diferencias entre ambos.

A pesar de la disminución de la concentración de las dos formas de nitrógeno mineral analizadas, el contenido en nitrógeno total de la rizosfera de las plántulas inoculadas registraba valores superiores que el control y estas diferencias eran significativas.

La concentración de carbono orgánico disminuye significativamente en la rizosfera de las plantas inoculadas, aunque las diferencias no superan en ningún caso el 1 %, las diferencias entre tratamientos no son significativas.

La capacidad de intercambio catiónico presenta diferencias significativas en los tres tratamientos, aunque los resultados varían según el inóculo empleado. Bajo la influencia de *B. pumilus* aumenta la CIC, mientras que en el caso de *B. licheniformis* disminuye por debajo del control.

5.1.2. Análisis fisicoquímico de los suelos rizosféricos de plántulas crecidas en suelo B

En el suelo B, los experimentos se realizaron separados en el tiempo por lo que cada tratamiento tiene su control. Los resultados correspondientes a esta parte del experimento aparecen en la Tabla 5.II y cada valor es la media de los resultados obtenidos en los cuatro tiempos de muestreo. En esta Tabla aparece la significación de las diferencias según el LSD, realizado en aquellos casos en los que el ANOVA (Tablas de la VII a la XII, Apéndice 2) resultó significativo, según se detalla en el Apartado 2.3.3.1 de Materiales y Métodos.

Tabla 5.II. Resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica de los suelos rizosféricos procedentes de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas crecidas en el suelo B. Cada valor es la media de 12 réplicas por tratamiento. El error estándar aparece en cursiva. Las letras a, b indican la significación de las diferencias según el LSD para *B. pumilus* y su control, y las letras x, y, para *B. licheniformis* y su control; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

	pH	NH_4^+ µg/ g suelo	NO_3^- µg/ g suelo	N total µg/ g suelo	C orgánico %	CIC meq/100g suelo
Control	8,14±*0,11* a	0,24±*0,13* a	3,72±*2,44* a	0,87±*0,28* a	2,75±*0,35* a	18,5±*2,60* a
B. pumilus	8,33±*0,24* b	0,28±*0,09* a	3,72±*0,99* a	0,98±*0,25* a	2,56±*0,44* a	19,42±*4,50* a
Control	7,36±*0,28* x	0,19±*0,07* x	1,75±*0,38* x	1,23±*0,05* x	2,75±*1,50* x	14,88±*2,32* x
B. licheniformis	7,08±*0,10* y	0,23±*0,08* y	1,98±*0,58* x	1,41±*0,03* x	2,75±*0,82* x	15,16±*1,35* x

Los valores de pH de los suelos empleados para los experimentos realizados con *B. pumilus* presentan valores de pH más básicos que los empleados en las experiencias con *B. licheniformis*. Sólo en el caso de la inoculación con *B. licheniformis* se aprecia una significativa disminución del pH.

Los valores de amonio detectados en la rizosfera de plántulas inoculadas con *B. pumilus* y no inoculadas no presenta diferencias significativas. Sin embargo, bajo la influencia de *B. licheniformis*, los valores aumentan significativamente. Con respecto a los resultados obtenidos

en el análisis de la concentración de nitrato, no se encuentran diferencias significativas entre cada tratamiento y su control en ningún caso. Tampoco se aprecian diferencias significativas en ninguno de los restantes parámetros analizados: nitrógeno total, carbono orgánico y CIC

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

5.2. Caracterización de los exudados recogidos de plántulas inoculadas y no inoculadas crecidas en los suelos A y B

En los exudados obtenidos en cada momento de muestreo, procedentes de plántulas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas, crecidas en los suelos A y B, se analizaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, amonio, nitrato, nitrogeno total y carbono orgánico, y bioquímicos: proteínas, azúcares y lípidos.

5.2.1. Exudados recogidos de plántulas crecidas en el suelo A

La caracterización de los exudados extraídos de plántulas crecidas en el suelo A aparece en la Tabla 5.III. En esta Tabla se muestra la significación de las diferencias según el LSD en aquellos casos en los que el ANOVA demuestra diferencias significativas (Tablas XIII a XIX, Apéndice 2), según se describió en el apartado 2.3.3.2. de Materiales y Métodos. Cada dato es la media de los resultados obtenidos en los cuatro tiempos de muestreo.

Tabla 5.III. Resultados correspondientes a la caracterización de los exudados extraídos de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas crecidas en el suelo A. Cada valor es la media de 12 réplicas por tratamiento. El error estándar aparece en cursiva. Las letras a, b indican la significación de las diferencias según el LSD; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

	pH	NO_3^- µg/ mL	N total µg/ mL	C organico %	Proteínas µg/ mL	Azúcares µg/ mL	Lípidos µg/ mL
Control	7,22±*0,16*a	1,68±*0,93*a	0,13±*0,06*a	0,12±*0,12*a	3,95±*0,42*a	10,25±*10,4*a	2,49±*0,97*
B. pumilus	6,92±*0,12*b	3,85±*0,57*b	0,22±*0,05*b	0,037±*0,04*a	4,45±*0,89*b	13,62±*8,60*b	2,62±*1,40*
B. licheniformis	6,71±*0,31*c	5,12±*1,15*c	0,25±*0,07*b	0,087±*0,05*a	5,20±*3,24*c	16,0±*19,12*c	3,10±*1,60*

El pH de los exudados liberados por las plantas control es ligeramente básico. Sin embargo, bajo la influencia de ambas bacterias se produce un descenso del pH, hecho especialmente marcado cuando la inoculación se realiza con *B. licheniformis*.

El nitrógeno amonio presentaba en todos los casos valores por debajo del límite de resolución del método de análisis empleado.

Los exudados de las plantas control presentan contenidos de nitrato significativamente mayores que los de plantas inoculadas, a su vez la concentración de nitrato es significativamente mayor cuando la inoculación se realiza con *B. licheniformis*.

Con respecto a la concentración de nitrogeno total se aprecia un significativo incremento en la exudación de compuestos nitrogenados cuando se inoculan las plantas, aunque en este caso no se aprecian diferencias significativas.

La concentración de carbono orgánico experimenta una ligera disminución en los exudados de plántulas inoculadas y no es significativa en ningún caso con repecto al control.

Tanto el contenido protéico como el de azúcares y lípidos resultó ser mayor en los exudados de las plántulas inoculadas con respecto a las plantas control. Las diferencias fueron especialmente acusadas, en todos los casos, cuando la inoculación se realizó con *B. licheniformis*.

El análisis cualitativo de lípidos se realizó a partir del extracto resuspendido, que se analizó por cromatografía en capa fina. En las Figuras 5.1 y 5.2, se expone una representación esquemática de la separación cromatográfica de los lípidos extraídos de los exudados de plántulas de aliso inoculadas con *B. pumilus* y *B. licheniformis* y no inoculadas, en los cuatro tiempos de muestreo. La separación se produce en orden decreciente de polaridad. En el punto de aplicación quedan los fosfolípidos, más polares, y junto al frente cromatográfico se detectan los ésteres de esteroles, más apolares. Entre ambos, y en orden decreciente de polaridad: monoglicéridos, diglicéridos, esteroles, ácidos grasos libres y triglicéridos. No existen diferencias importantes entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento, ni entre tratamientos. Todos los exudados muestran la presencia de ésteres de esteroles en cantidad apreciable, el resto de las manchas corresponden con fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos, esteroles y ácidos grasos. Sin embargo en las Figuras 5.23. y 5.24 se puede observar que las manchas correspondientes a los tratamientos inoculados presentan una menor abundancia de ésteres de esteroles en todos los tiempos de muestreo.

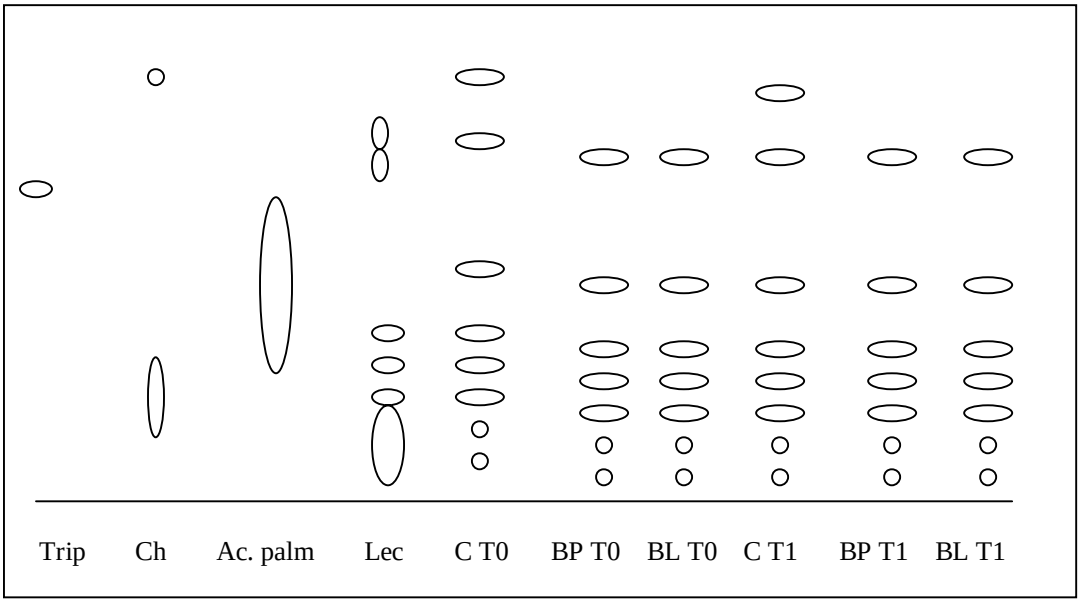


Figura 5.1. Representación de la separación cromatográfica de lípidos extraídos de exudados de plantas no inoculadas (control-C-) e inoculadas con *B. pumilus* (P) y *B. licheniformis* (L), en el suleo A, en T0 y T1. En las posiciones 1, 2, 3 y 4 aparecen los patrones (Trp: tripalmitato, Ch: colesterol, Palm: ac.palmítico, Lec: lecitina).

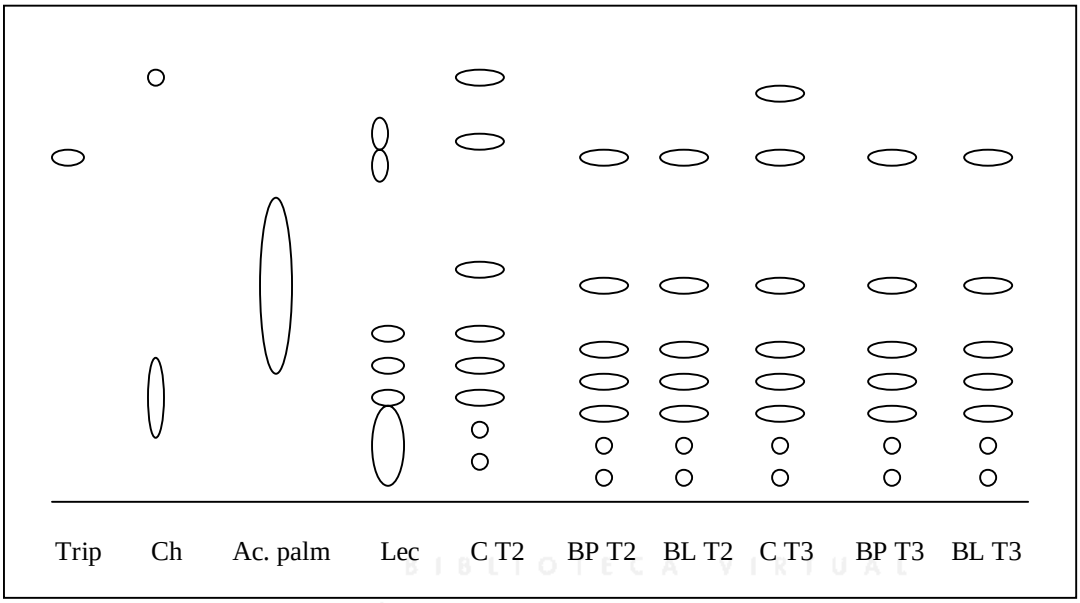


Figura 5.2. Representación de la separación cromatográfica de lípidos extraídos de exudados de plantas no inoculadas (control-C-) e inoculadas con *B. pumilus* (P) y *B. licheniformis* (L), en el suelo A, en T2 y T3. En las posiciones 1, 2, 3 y 4 aparecen los patrones (Trp: tripalmitato, Ch: colesterol, Palm: ac.palmítico, Lec: lecitina).

5.2.2. Exudados recogidos de plántulas crecidas en el suelo B

La caracterización de los exudados extraídos de plántulas crecidas en el suelo B aparece en la Tabla 5.IV. En esta Tabla se muestra la significación de las diferencias según el LSD en aquellos casos en los que el ANOVA (Tablas XX a XXVI, Apéndice 2) resultó significativo, según se describió en el apartado 2.3.3.2 de Materiales y Métodos. Cada dato es la media de los resultados obtenidos en los cuatro tiempos de muestreo.

Tabla 5.IV. Resultados correspondientes a la caracterización de los exudados extraídos de plantas inoculadas con *B. pumilus* o *B. licheniformis* y no inoculadas crecidas en el suelo B. Cada valor es la media de 12 réplicas por tratamiento. El error estándar aparece en cursiva. Las letras a, b indican la significación de las diferencias según el LSD entre *B. pumilus* y su control, y las letras x, y, entre *B. licheniformis* y su control; letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p<0.05$)

	pH	NO_3^- µg/ mL	N total µg/ mL	C organico %	Proteínas µg/ mL	Azúcares µg/ mL	Lípidos µg/ mL
Control	7,81±*0,11* a	4,67±*1,03* a	0,66±*0,08* a	0,10±*0,07* a	3,60±*0,46*	6,87±*0,20* a	7,31±*1,92*
B. pumilus	7,62±*0,26* b	4,91±*1,40* a	0,71±*0,12* a	0,22±*0,03* b	3,57±*0,54*	11,37±*7,20*b	6,30±*3,45*
Control	7,97±*0,06* x	4,86±*2,02* x	0,15±*0,007* x	0,16±*0,07* x	4,20±*1,60*	18,87±*7,70*x	9,80±*4,20*
B.licheniformis	8,20±*0,23* y	6,97±*2,46* y	0,21±*0,11* y	0,09±*0,09* y	6,02±*2,03*	22,6±*6,70* x	8,60±*0,67*

En este suelo, los valores de pH de los exudados son más básicos que los procedentes de plántulas crecidas en el suelo A. Las variaciones a lo largo del experimento son acusadas en el

tratamiento con *B. pumilus* donde se detecta una significativa acidificación, mientras que con *B. licheniformis* se observa el efecto contrario.

El nitrógeno amonio presentaba en todos los casos valores por debajo del límite de resolución del método de análisis empleado.

En el suelo B, el contenido en nitratos de los exudados en las plantas inoculadas con *B. pumilus* no se altera significativamente con respecto a su control. Sin embargo, en el caso de *B. licheniformis*, se detecta un incremento significativo bajo las plantas inoculadas. Se observa exactamente la misma tendencia en el nitrógeno total.

Con respecto al contenido en carbono orgánico, los exudados de plántulas inoculadas con *B. pumilus* presentaron niveles significativamente mayores que los de plántulas control. En el caso de *B. licheniformis* la tendencia fue opuesta.

El análisis bioquímico de los exudados no demuestra diferencias significativas con respecto a la concentración de proteínas. Sin embargo, la concentración de azúcares fue significativamente mayor en los exudados de plántulas inoculadas con *B. pumilus*.

El análisis cuantitativo de lípidos extraídos de los exudados de plántulas inoculadas es menor que en sus respectivos controles. El análisis cualitativó se realizó sobre el extracto resuspendido, que se analizó por cromatografía en capa fina; en las figuras 5.3 (*B. pumilus*) y 5.4 (*B. licheniformis*) se representa la separación cromatográfica. La separación se produce en orden decreciente de polaridad. En el punto de aplicación quedan los fosfolípidos, más polares, y junto al frente cromatográfico se detectan los ésteres de esteroles, más apolares. Entre ambos, y en orden decreciente de polaridad: monoglicéridos, diglicéridos, esteroles, ácidos grasos libres y triglicéridos. No existen diferencias entre tiempos de muestreo dentro de cada tratamiento, ni entre tratamientos. Todos los exudados muestran la presencia de ésteres de esteroles en cantidad apreciable y una menor presencia de fosfolípidos en los exudados correspondientes a T0 y T1; el resto de las manchas corresponden con fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos, esteroles y ácidos grasos.

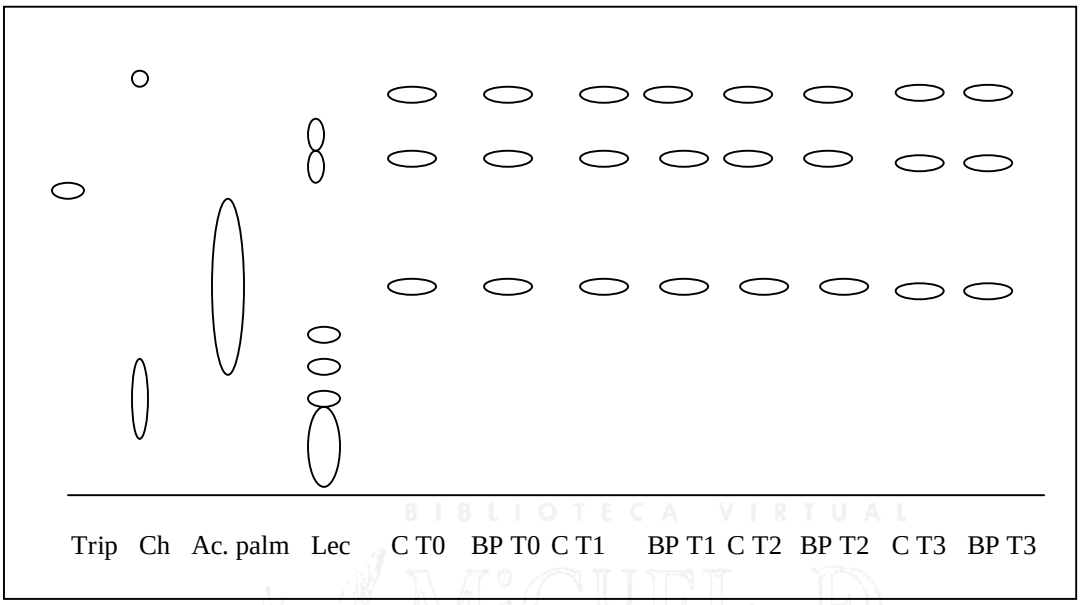


Figura 5.3. Representación de la separación cromatográfica de los lípidos extraídos de exudados de plantas no inoculadas (control-C-) e inoculadas con *B. pumilus* (P), crecidas en el suelo B en T0, T1, T2 yT3. En las posiciones 1, 2, 3 y 4 aparecen los patrones (Trp: tripalmitato, Ch: colesterol, Palm: ac.palmítico, Lec: lecitina).

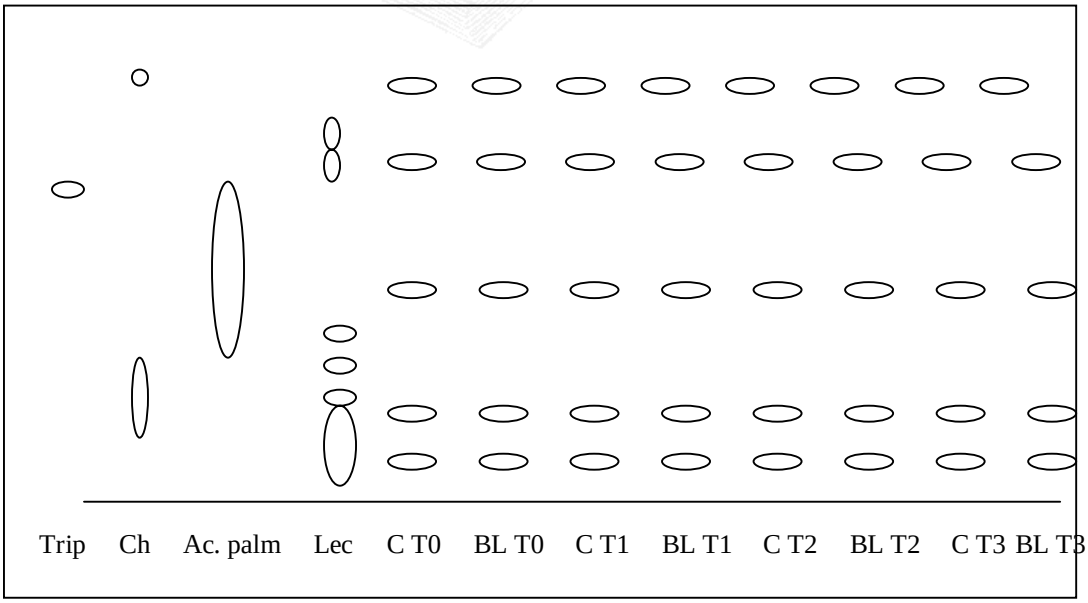


Figura 5.4. Representación de la separación cromatográfica de los lípidos extraídos de exudados de plantas no inoculadas (control –C-) e inoculadas con *B. licheniformis* (L), crecidas en el suelo B, en T0, T1, T2 y T3. En las posiciones 1, 2, 3 y 4 aparecen los patrones (Trp: tripalmitato, Ch: colesterol, Palm: ac.palmítico, Lec: lecitina).

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA INOCULACIÓN DE *A.glutinosa* CON *B. pumilus* Y *B. licheniformis* SOBRE LA EXUDACIÓN RADICAL Y SU INCIDENCIA EN CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SISTEMA RIZOSFÉRICO

En este apartado de la presente Memoria se ha realizado un estudio de la influencia de la inoculación con *B. pumilus* o *B. licheniformis* sobre la exudación radical, y cómo incide sobre las características fisicoquímicas a nivel edáfico. El experimento se ha desarrollado sobre dos suelos distintos, comparando el efecto de la inoculación con cada una de las bacterias en cada suelo. Dado que las reforestaciones suelen realizarse en suelos empobrecidos, el análisis de los parámetros fisicoquímicos a nivel rizosférico revierte especial interés. Esto se debe a que los resultados del análisis nos pueden indicar la disponibilidad de nutrientes, el efecto de la inoculación sobre la fisiología de la planta, y su incidencia a nivel radical. Por otra parte el efecto biológico de una PGPR puede ser el resultado de más de una actividad, como ya se indicó anteriormente, los mecansimos de acción de una PGPR se pueden clasificar en dos grandes grupos, directos o indirectos (Kloepper, 1993). En esta parte del estudio consideramos el efecto promotor del crecimiento vegetal que estas bacterias pudieran tener a través de la mejora en la nutrición nitrogenada además de utilizar la exudación radical como indicador del efecto fisiológico de la inoculación.

Se ha demostrado la presencia de una amplia gama de compuestos orgánicos en los exudados: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, proteínas, hormonas, etc.. Dada la enorme variedad de compuestos orgánicos detectados en los exudados, hemos centrado nuestro análisis en los más citados en la bibliografía y con un papel previsiblemente importante como compuestos energéticos (Grayston *et al*., 1996), aunque sólo analicemos una pequeña parte de los compuestos orgánicos que se liberan vía exudación. Hemos analizado azúcares, lípidos y proteínas, el estudio de estos grupos de compuestos en los exudados radicales está bastante generalizado como refrenda la abundante literatura al respecto (Rovira, 1956, Ayers y Thronton, 1968, Vancura, 1964, Svenningsson *et al.*, 1990, Ström *et al.*, 1994, Hodge *et al.*, 1998)

Otra de las consideraciones que debemos hacer respecto a los métodos empleados, es la forma de obtención de los exudados. Los trabajos realizados por distintos autores se centran sobre exudados radicales, mayoritariamente de plantas no diazotróficas (Ayers y Thronton, 1968, Bolton *et al.*, 1989, Svenningsson *et al.*, 1990). La mayoría de estos métodos recogen los exudados en vivo con objetivos básicamente analíticos. Para ello emplean soportes inertes como perlita (Ayers y Thornton, 1969) o disoluciones donde se han desarrollado las plantas (Rovira, 1956, Solouchana, 1962). Los exudados se recolectaron según el método de Ström *et al.* (1994). En este método la planta se desarrolla en un suelo que determina en gran medida la cantidad y calidad de la producción de exudados. Posteriormente se recogen los exudados producidos por la planta en un corto intervalo de tiempo en agua destilada. A pesar del estrés que puede suponer para la planta el cambio de medio, estos autores detectan un cambio cualitativo en el tipo de exudación directamente relacionado con las necesidades nutritivas de la planta y las condiciones impuestas por el suelo. No obstante, la rotura de algunas raíces finas resulta

inevitable, por lo que es imposible discriminar entre exudados propiamente dichos y compuestos procedentes de la lísis celular.

Juo y Stotzky (1970) son los primeros autores que hemos encontrado en la literatura consultada que emplean el método de Lowry *et al.,* (1951) para estimar cuantitativamente las proteínas totales en exudados radicales, utilizando como material biológico guisante, maíz y girasol. Actualmente autores como Hodge *et al.,* (1998) siguen utilizando este análisis en los exudados de otras plantas. El rendimiento de esta técnica es aceptable como ponen de manifiesto los autores arriba citados.

El método empleado para la determinación de lípidos (Bligh y Dyer, 1959), permite una rápida identificación y rinde buenos resultados. Sin embargo, tal y como señalan Svenningsson *et al.* (1990), existen dificultades a la hora de determinar los lípidos de los exudados, dada su insolubilidad en disoluciones acuosas (como el medio de recolección de los exudados) y la tendencia a ser adsorbidos por los medios de soporte.

En los resultados obtenidos de la caracterización de los exudados podemos observar la fuerte influencia del sustrato en su composición. En el suelo A se observa un significativo aumento en la concentración de NO_3^- y nitrógeno total en los suelos inoculados, así como una significativa disminución del pH, especialmente acusada bajo la influencia de *B. licheniformis*. En el suelo B, el pH sufre alteraciones menos acusadas y las concentraciones de nitrato y nitrógeno total sólo aumentan significativamente bajo el efecto de *B. licheniformis*.

Estos resultados confirman lo ya indicado por otros autores que obtienen fuertes alteraciones en la concentración de diversos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos cuando se alteran las características del sustrato (Zhang *et al*, 1997a, Jones, 1998).

Además de las variables comentadas y refiréndonos específicamente a los compuestos orgánicos analizados, también se aprecian incrementos significativos en la concentración de proteínas y azúcares cuando los exudados proceden de plantas crecidas en el suelo A.

No sólo detectamos un efecto acusado del sustrato sobre las pautas de exudación radical. Es también importante el efecto de los tratamientos sobre el proceso y su efecto diferencial según el tipo de suelo en el que se realiza la inoculación. En el suelo A, *B. pumilus* y *B. licheniformis* estimulan la liberación de nitrato y nitrógeno total siendo más acusado el efecto de *B. licheniformis,* especialmente sobre la liberación de nitrato; por otra parte, la exudación de proteínas y azúcares se ve más estimulada por *B. licheniformis*. En el suelo B, apenas se detecta el efecto *B. pumilus,* y el efecto de *B. licheniformis* es menos marcado en todos los casos.

Por otra parte, es importante tener en cuenta las variaciones de pH. El descenso del pH en los exudados de las plantas inoculadas es más acusado en el suelo A y bajo la

influencia de *B. licheniformis*. La acidificación del sistema rizosférico puede ser consecuencia de distintos factores que se discutirán más adelante, pero de antemano, y debido a las condiciones en las que se recogen los exudados, podemos descartar el efecto de la microflora rizobacteriana, y atribuir la bajada del pH a los procesos de absorción de nutrientes. Este proceso está asociado al intercambio de protones mediante sistemas de cotransporte o antiporte, según la carga del nutriente de que se trate (Jones, 1997). En cualquier caso, la acidificación del medio está indicando uan mayor actividad de intercambio, asociada al grado de actividad fisiológica de la planta, lo que adquiere relevancia dado que la mayor acidificación se aprecia en el suelo A bajo el efecto de *B. licheniformis*, siendo importantes los efectos biológicos desencadenados por esta cepa en el suelo A (ver Apartado 3.1. y 3.2 de Resultados)

En la caracterización de los suelos rizosféricos en cada momento de muestreo, se han incluido parámetros generales relacionados con la dinámica del nitrógeno, como el nitrógeno total o el carbono orgánico. Se han estimado también otros más específicos como el nitrógeno nitrato y el nitrógeno amonio. Ambos son indicadores de la actividad biológica de los grupos funcionales que utilizan estos iones como fuente energética para su desarrollo o como productos de su metabolismo.

La caracterización de la rizosfera de las plantas de aliso, crecidas en los suelos A y B, revela diferencias entre ambas, siendo de nuevo más acusado el efecto de los tratamientos en el suelo A. Por otra parte, considerando cada suelo por separado, podemos apreciar que en el suelo A todos los parámetros evaluados varían significativamente con respecto a las plantas control.

Es interesante mencionar el aumento de nitrógeno total y la disminución de carbono orgánico y nitrato en la rizosfera de las plantas inoculadas con ambas cepas. La concentración de amonio también disminuye bajo el efecto de ambas cepas pero de forma más acusada bajo la influencia de *B. licheniformis*. Todos estos resultados indican un sistema rizosférico más activo en las plantas inoculadas. Por una parte, la mayor riqueza en nitrógeno total se puede atribuir a la liberación de compuestos orgánicos nitrogenados vía exudación, o bien al aporte de nitrogeno que supone la inoculación (10^8 ufc/g suelo). Tratandose de plantas jóvenes, que todavía no han podido desarrollar nódulos en sus raíces, la disponibilidad de nitrógeno es limitada, por lo que podemos descartar la primera hipótesis, cobrando importancia la segunda. Por otra parte, la significativa disminución de amonio y nitrato en la rizosfera, teniendo en cuanta la capacidad mineralizadora de ambas cepas (Acero *et al.*, 1994), también habla de la demanda de nitrógeno por la planta, estimulada tanto por *B. pumilus* como por *B. licheniformis*, y apoya de nuevo el hecho de que el aumento de nitrogeno total se debe al aporte de nitrógeno vía inoculación.

Mención aparte merece el descenso de pH bajo el efecto de ambas cepas. Como ya se ha indicado anteriormente al discutir la disminución del pH de los exudados, la disminución del pH en el suelo rizosférico puede deberse a varias razones: aumento del intercambio de nutrientes, como el amonio, o los cationes de cambio, especialmente acusado bajo la influencia de *B.*

licheniformis, por un sistema de antiporte (Poole, 1998), liberación de ácidos orgánicos para mejorar la absorción de nutrientes (Jones y Darrah, 1994) y producción de CO_3H^- por aumento de la actividad microbiana (Jones, 1997).

En cualquier caso, estos resultados junto con los obtenidos en el análisis de los exudados indican un acusado incremento de la actividad fisiológica de la planta bajo el efecto de los inóculos en el suelo A, mientras que en el suelo B, los efectos son mucho menos acusados. Todos los resultados coinciden en señalar que la eficacia de la inoculación es apreciablemente mayor en el suelo de origen.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GIBERELINAS POR *B. pumilus* Y *B. licheniformis*

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

7.1. Pruebas biológicas

Los ensayos biológicos se realizan mediante aplicación a nivel de brote de soluciones de concentración variable de GA_3 y de los medios de cultivo concentrados en los que crecieron las bacterias, libres de estas células (Materiales y Métodos 2.4.1). El estudio se concreta sobre plántulas de aliso previamente enanizadas con PCB.

En las tablas donde se exponen los resultados, las concentraciones (ppm) de GA_3 ensayadas coinciden con el grado de concentración de los medios de cultivo ensayados, excepto la primera (10x) que corresponde a 5 ppm de GA_3; es decir, en la misma columna (encabezada por 10x) aparecen los resultados de 5 ppm de GA_3 y de los medios de cultivo 10 veces concentrado. No se ensayó la concentración de 80 ppm de GA_3 porque en estudios previos de aproximación resultó excesiva, dando lugar a un excesivo ahilamiento del tallo, con la consecuente pérdida de consistencia del tallo. En todos los casos se incluyen datos de plantas normales de la misma edad.

Los resultados de longitud aérea total aparecen en la Tabla 7.I. El ANOVA indica que existen diferencias significativas ($p<0,05$), tanto entre tratamientos como entre las concentraciones probadas y en la interacción. La significación según el LSD aparece en la Tabla 7.II.

Tabla 7.I. Datos de longitud aérea total de plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y con los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados x10, x20, x40 y x80 veces. Los datos son la media de tres valores ± el error estándar. * ensayo no realizado. ** Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

L.A. (cm)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	2,82 ± 0,08	5,00 ± 0,33	5,39 ± 0,07	7,57 ± 0,62	*
B. pumilus	2,82 ± 0,08	**	3,38 ± 0,06	3,10 ± 0,61	5,05 ± 0,23
B. licheniformis	2,82 ± 0,08	3,26 ± 0,35	4,08 ± 0,12	**	5,42 ± 0,24
CTRLsin PCB	6,53 ± 0,17				

Los incrementos de concentración tanto de GA_3 como de los medios de cultivo inducen incrementos de longitud aérea. El medio de cultivo de *B. licheniformis* 20 y 80 veces concentrado muestra diferencias significativas respecto del control de plantas enanas y entre las distintas concentraciones aplicadas; el "efecto giberelina" es directamente proporcional a las veces que se concentra el medio. No podemos comparar los efectos biológicos de *B. pumilus* con los de *B. licheniformis* en los ensayos realizados con los medios 10x y 40x, pero sí en los 20x. En éstos se observa que los efectos de los medios de ambas bacterias no son diferentes entre sí pero sí con respecto al control, siendo mayor el efecto de *B. licheniformis*. Sin embargo,

los medios de cultivo de las dos bacterias concentrados 80 veces provocaban el mismo efecto biométrico en la planta y éste era igual al causado por la aplicación de 20 ppm de GA_3.

Estos resultados nos inducen a pensar en una composición diferente en cuanto a las GAs presentes en los medios de cultivo o bien una semejante composición pero con distintas concentraciones.

Tabla 7.II. Significación de las diferencias según el LSD

		Ctrl	BL			BP			GA_3	
			80x	20x	10x	80x	40x	20x	40	20
GA_3	5	*	NS	*	*	NS	*	*	*	NS
	20	*	NS	*	*	NS	*	*	*	
	40	*	*	*	*	*	*	*		
BP	20x	NS	*	NS	NS	*	NS			
	40x	NS	*	*	NS	*				
	80x	*	NS	*	*					
BL	10x	NS	*	NS						
	20x	*	*							
	80x	*								

En las Figuras 7.1. y 7.2. aparecen las fotografías de las plantas enanizadas a las que se les aplicó el medio de cultivo de *B. pumilus* o *B. licheniformis* 10 y 80 veces concentrado, junto a las plantas control enanas.

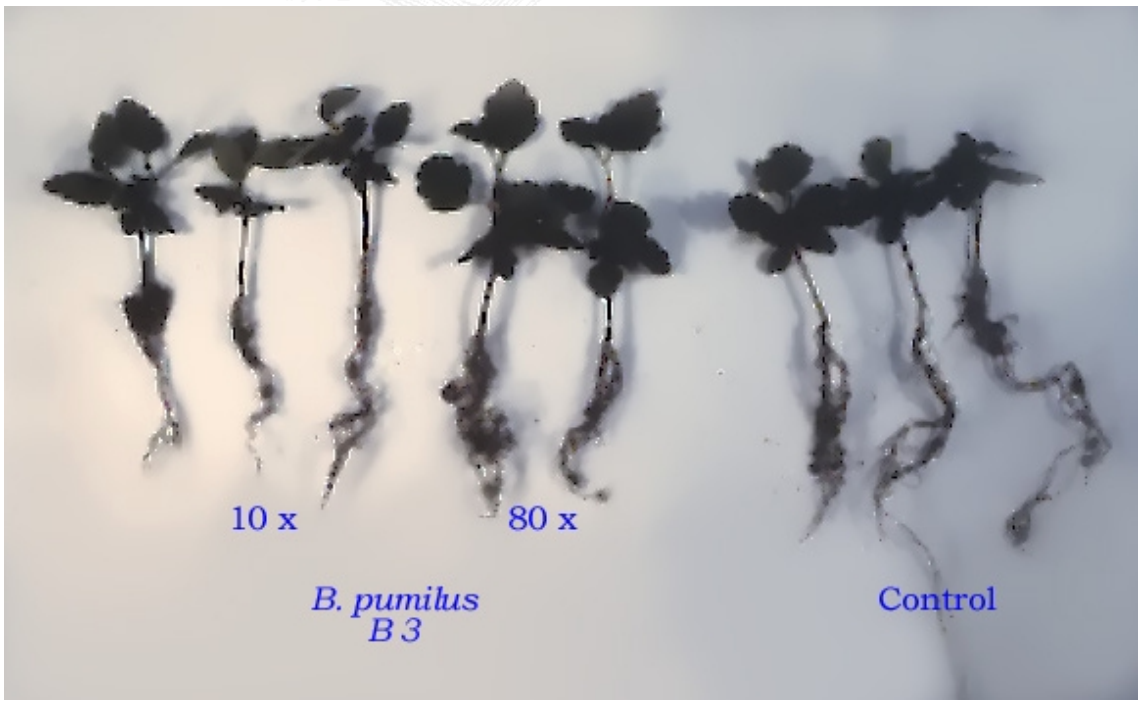


Figura 7.1. Fotografía de de las plantas enanizadas a las que se les aplicó el medio de cultivo de *B. pumilus* 10 y 80 veces concentrado, junto a las plantas control.

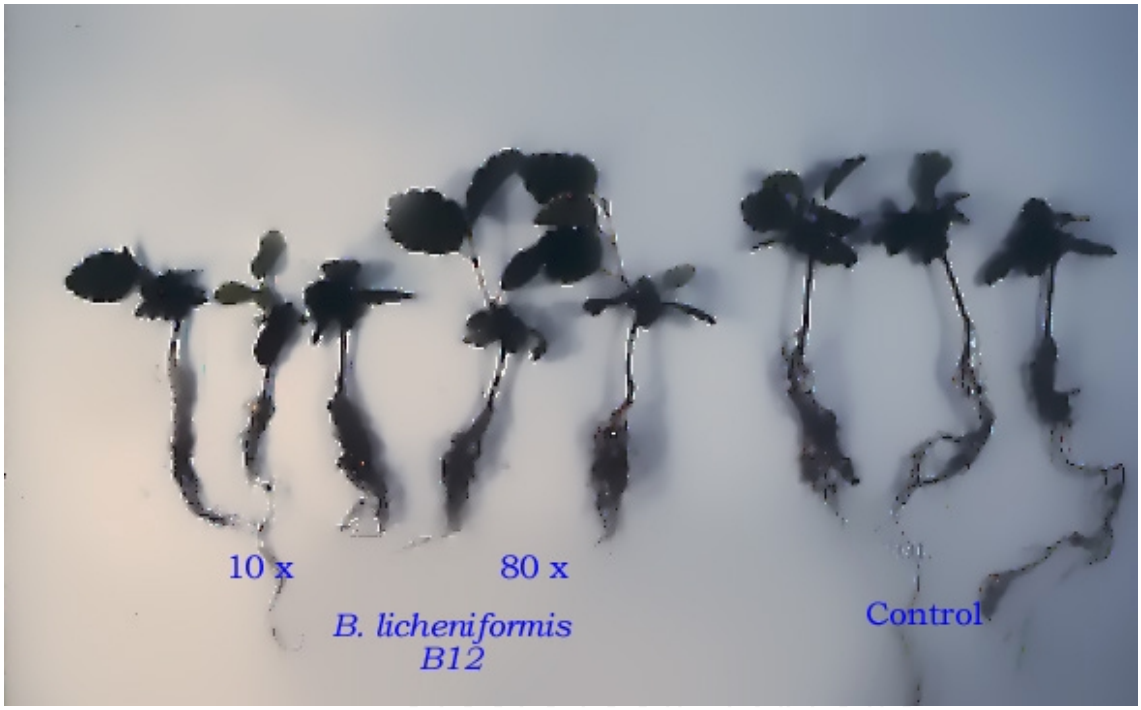


Figura 7.2. Fotografía de de las plantas enanizadas a las que se les aplicó el medio de cultivo de *B. licheniformis* 10 y 80 veces concentrado, junto a las plantas control.

Además del ANOVA, con los datos de longitud aérea se trazó una recta de regresión para cada tratamiento. Estas rectas aparecen representadas en la Figura 7.3, junto con su coeficiente de correlación. Como se puede apreciar el ajuste de las rectas de regresión es muy alto en todos los casos, nunca inferior al 80 %, detectándose una respuesta lineal a la aplicación de GA_3 o medios de cultivo.

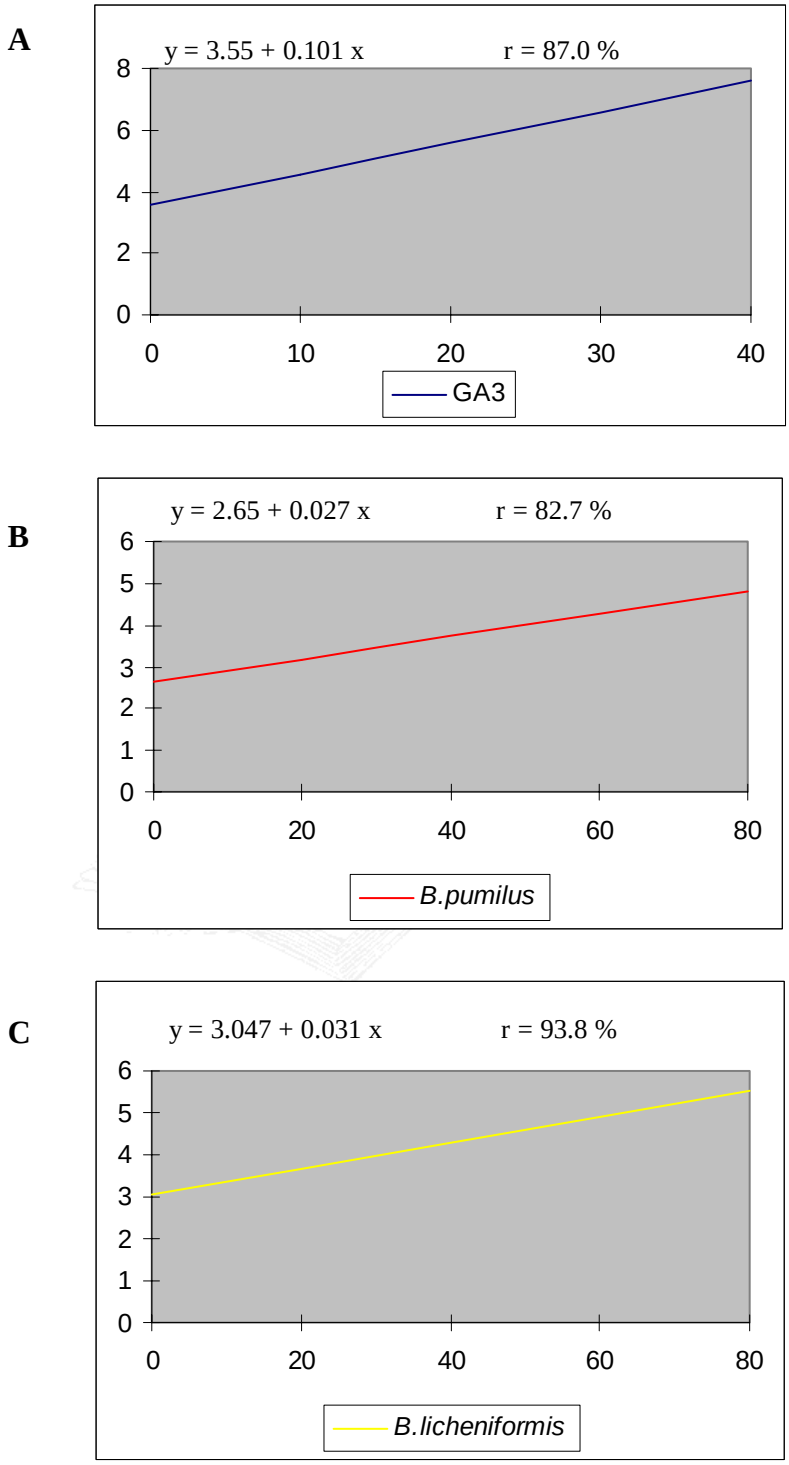


Figura 7.3. Representación de las rectas de regresión realizadas con los resultados de longitud aérea (cm) correspondientes al tratamiento con distintas concentraciones (5, 20 y 40 ppm) de GA_3 (A), el medio de *B. pumilus* (B) o *B. licheniformis* (C) 10, 20, 40 y 80 veces concentrado.

Los resultados de longitud del brote aparecen en la Tabla 7.III. El ANOVA revela la existencia de diferencias significativas ($p<0.01$) entre tratamientos, concentraciones y en la interacción. La significación de las diferencias según el LSD aparece en la Tabla 7.IV.

Tabla 7.III. Datos de longitud del brote de plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados x10, x20, x40 y x80 veces. Los datos son la media de tres valores ± el error estándar. * ensayo no realizado. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento.

L. brote (cm)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	0	2,5 ± 0,33	1,38 ± 0,47	5,26 ± 0,95	*
B. pumilus	0	**	1,33 ± 0,27	1,35 ± 0,36	3,07 ± 0,02
B. licheniformis	0	1,51± 0,41	1,84 ± 0,23	**	3,26 ± 0,05

Los medios concentrados 20 veces tenían el mismo efecto que la solución de 20 ppm de GA_3, aunque como en el caso anterior se observó más efecto en el medio de cultivo de *B. licheniformis*. El tratamiento de 40 ppm de GA_3 tenía de nuevo un efecto significativamente mayor que los medios de *B. pumilus* o *B. licheniformis* 80 veces concentrados. El tratamiento de GA_3 no provoca una respuesta lineal tan ajustada como en el caso anterior. La respuesta detectada frente a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* en todas las concentraciones ensayadas, indica la presencia de hormonas de tipo giberelina en el medio de cultivo bacteriano. El medio de *B. licheniformis* cuando se aplicó 80 veces concentrado provocó una elongación del brote del orden del doble que cuando se aplicó 20 veces concentrado; *B. pumilus* tuvo el mismo comportamiento, es decir, el efecto fue apreciablemente más acusado que cuando se considera la longitud aérea total.

Tabla 7.IV. Significación de las diferencias según el LSD

		BL			BP			GA_3	
		80x	20x	10x	80x	40x	20x	40	20
GA_3	5	*	*	*	NS	*	*	*	NS
	20	*	NS	NS	*	NS	NS	*	
	40	*	*	*	*	*	*		
BP	20x	*	NS	NS	*	NS			
	40x	*	NS	NS	*				
	80x	*	*	*					
BL	10x	*	NS						
	20x	*							
	80x								

Como en el caso anterior, además del ANOVA, con los datos de longitud del brote se trazó una recta de regresión para cada tratamiento. Estas rectas aparecen representadas en la Figura 7.4, junto con su coeficiente de correlación. Al igual que en la longitud aérea total, se aprecia una correlación positiva entre el efecto biológico y la concentración de giberelina,

siendo los coeficientes de correlación elevados para los dos medios de cultivo y menor que en el caso anterior para las experiencias de aplicación de GA_3.

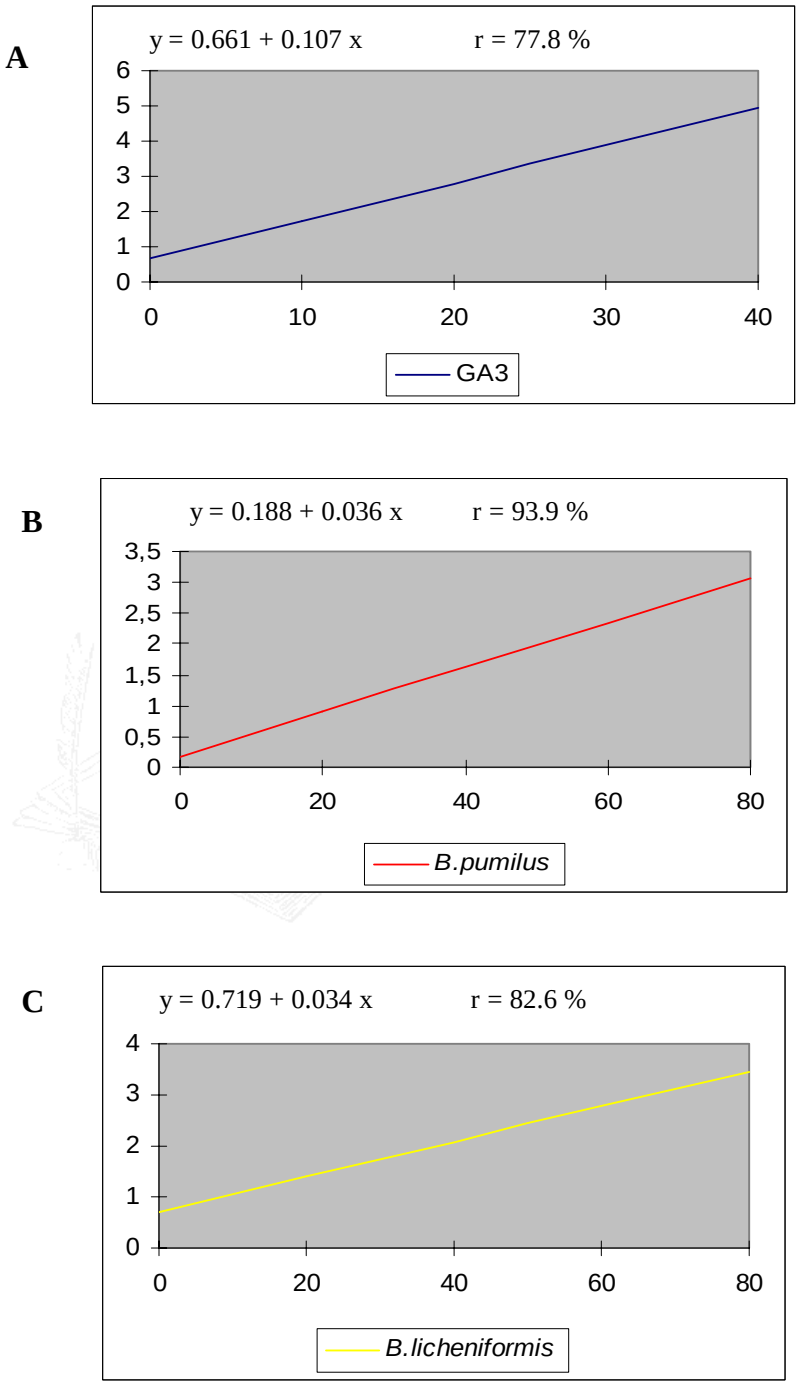


Figura 7.4. Representación de las rectas de regresión realizadas a partir de los resultados de longitud aérea del brote (cm) con los tratamientos con distintas concentraciones (5, 20 y 40 ppm) de GA_3 (A), el medio de *B. pumilus* (B) o *B. licheniformis* (C) 10, 20, 40 y 80 veces concentrado.

En cuanto a la superficie del brote, los resultados aparecen en la Tabla 7.V. El análisis de la varianza indica la existencia de diferencias significativas ($p<0.05$) sólo entre las distintas concentraciones del tratamiento, pero no entre tratamientos o en la interacción.

Se puede apreciar un incremento de la superficie del brote correlacionado positivamente con la concentración del medio de cultivo, tanto procedente de *B. licheniformis* como de *B. pumilus*, siendo más acusado el efecto en el primer caso, con un ajuste de 90.6 %. Sin embargo, no se observa un efecto sobre la superficie foliar cuando se aplica GA_3, la relación deja de ser lineal y el valor de la *r* es de un 21.4%.

Tabla 7.V. Datos de superficie del brote de las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y de los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados x10, x20, x40 y x80 veces. Los datos son la media de tres valores ± el error estándar. * ensayo no realizado. ** Plantas que murieron a lo largo del tratamiento.

S.brote (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	0	4,98± 1,52	3,81± 1,74	4,07± 0,21	*
B. pumilus	0	**	1,68± 0,49	2,00± 0,78	6,20± 0,08
B. licheniformis	0	2,17± 0,51	3,35± 0,27	**	7,17± 0,89

La representación de las rectas de regresión y su coeficiente de correlación aparecen en la Figura 7.5.

MIGUEL DE CERVANTES BIBLIOTECA VIRTUAL

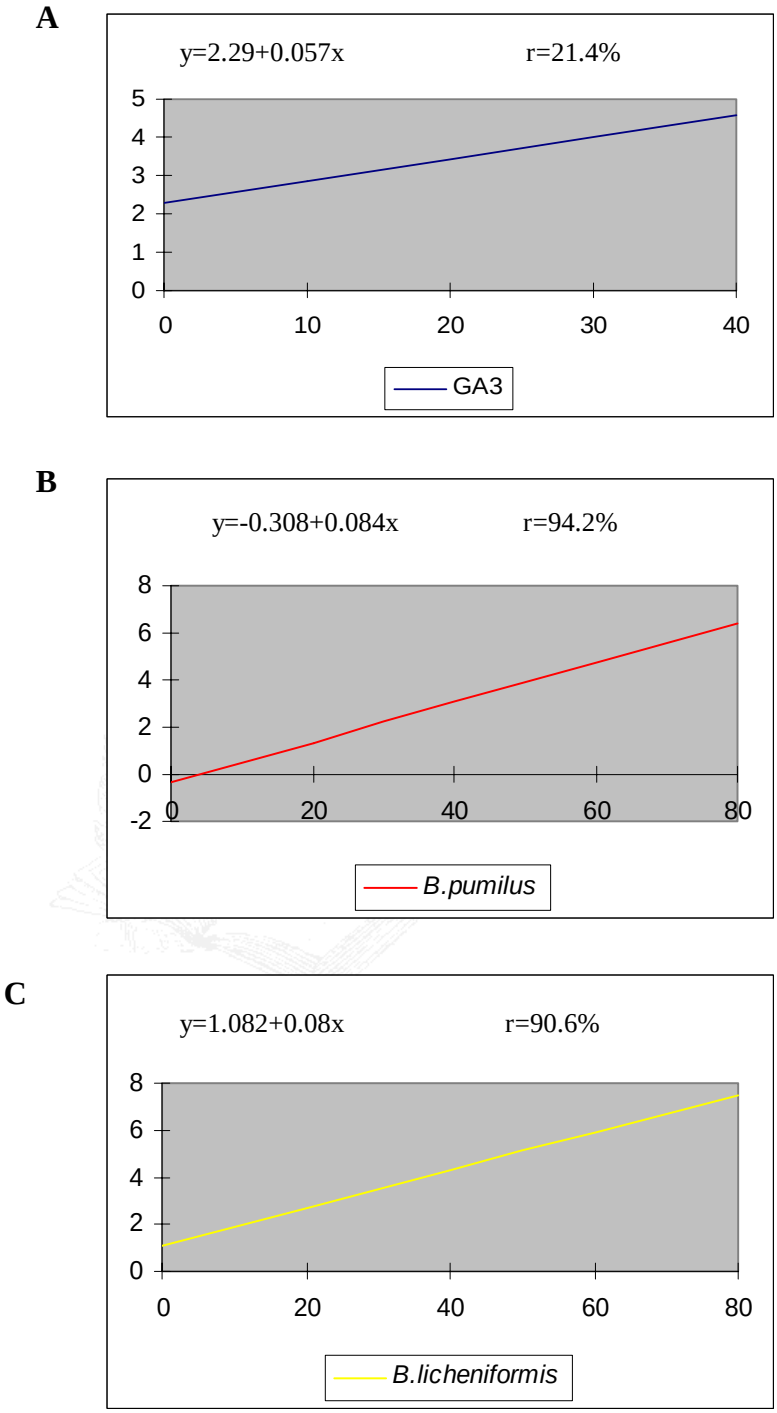


Figura 7.5. Representación de las rectas de regresión realizadas a partir de los resultados de superficie aérea del brote (cm^2) correspondientes al tratamiento con distintas concentraciones (5, 20 y 40 ppm) de GA_3 (A), el medio de *B. pumilus* (B) o *B. licheniformis* (C) 10, 20, 40 y 80 veces concentrado.

En cuanto a la superficie aérea total, los resultados aparecen en la Tabla 7.VI. El ANOVA indica que existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos, pero no en la interacción.

Los resultados de las medidas de superficie aérea total reflejan una fuerte disminución del coeficiente de correlación bajo la influencia de GA_3 y *B. pumilus*., si bien bajo *B. licheniformis* se alcanzaba un buen ajuste (Tabla 7.VI). En los tratamientos con los medios de cultivo se mantiene el efecto biológico detectado al considerar la longitud del brote, encontrándose valores similares bajo la influencia de ambas bacterias

Tabla 7.VI. Datos de superficie aérea total de las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados x10, x20, x40 y x80 veces. Los datos son la media de tres valores ± el error estándar. Recta de regresión y coeficiente de correlacion (r). * ensayo no realizado. ** Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

S.A. (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X	Regresión	r
GA_3	4,78 ± 1,03	7,45 ± 1,66	8,07 ± 1,58	6,38 ± 0,88	*	y = 6,18 + 0,028 x	10,7%
B. pumilus	4,78 ± 1,03	**	3,48 ± 0,13	3,95 ± 1,41	9,59 ± 0,25	y = 3,13 + 0,067 x	65,0%
B. licheniformis	4,78 ± 1,03	4,17 ± 0,70	5,68 ± 0,07	**	10,4 ± 0,26	y = 4,13 + 0,077 x	96,0%
CTRLsin PCB	27,36± 4,56						

En cuanto al número de hojas del brote, los resultados aparecen en la Tabla 7.VII. El ANOVA indicó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, concentraciones y en la interacción. Las diferencias significativas dentro de cada tratamiento según el LSD aparecen en la Tabla 7.VIII.

El número de hojas del brote no demuestra una correlación lineal en ningún caso. Si se observa un aumento en el número de hojas en los tratamientos con medio de cultivo bacterianos, a medida que se concentran.

Tabla 7.VII. Número de hojas del brote de las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados x10, x20, x40 y x80 veces. Los datos son la media de tres valores ± el error estándar. * ensayo no realizado. ** Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

Nº hojas brote	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	0	4,5± 0,50	4,5± 0,50	5,0± 0,0	*
B. pumilus	0	**	3,6± 0,47	4,0± 0,0	6,0± 0,0
B. licheniformis	0	2,6± 0,47	4,5± 0,50	**	4,0± 0,0

Tabla 7.VIII. Significación de las diferencias según el LSD

		BL			BP			GA_3	
		80x	20x	10x	80x	40x	20x	40	20
GA_3	5	NS	NS	*	*	NS	*	*	NS
	20	*	NS	*	*	NS	*	*	
	40	*	*	*	*	*	*		
BP	20x	NS	*	*	*	NS			
	40x	NS	NS	*	*				
	80x	*	*	*					
BL	10x	*	*						
	20x	NS							
	80x								

Los resultados de los parámetros biométricos correspondientes a la parte radical de la planta aparecen en las Tablas 7.IX. y 7.X. En ningún caso se vieron afectadas ni la longitud ni la superficie radical por la aplicación de ninguno de los tratamientos, puesto que ésta era en el meristemo aéreo apical. Resulta interesante destacar que la longitud radical sí se vio afectada por la aplicación de PCB, que se realizó en el agua de riego, según se detalla en el apartado 2.4.1 de Materiales y Métodos.

Tabla 7.IX. Datos de superficie radical correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. * 80 ppm de GA_3. ** Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

S.R. (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	6,00± 0,82	3,76± 0,59	2,87± 0,62	2,71± 0,73	*
B. pumilus	6,00± 0,82	**	3,48± 0,04	3,22± 0,07	5,22± 0,82
B. licheniformis	6,00± 0,82	3,76± 1,22	3,45± 0,64	**	4,83± 0,21
CTRLsin PCB	7,18± 0,22				

Tabla 7.X. Datos de longitud radical correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. * 80 ppm de GA_3. ** Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

LR. (cm)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	11,61±3,08	6,90± 1,29	6,35± 0,61	6,38± 1,09	*
B. pumilus	11,61±3,08	**	8,21± 0,24	7,24± 0,71	6,58± 0,51
B. licheniformis	11,61±3,08	7,22± 1,12	5,72± 0,91	**	6,81± 0,81
CTRLsin PCB	39,69± 7,00				

7.2. Determinación de giberelinas por CG-MS

Después de procesar las muestras según se ha descrito en el apartado 2.4.1. de esta Memoria, se identificaron las siguientes giberelinas, cuantificándolas para cada bacteria (Tablas 7.XI y 7.XII).

Tabla 7.XI. Identificación de los MeTMSi derivados de las GAs mediante el análisis combinado de cromatografía de gases y espectrometría de masas en medio de cultivo de *B. pumilus*

GA	Fracción HPLC	KRI	Ion (m/z) y abundancia relativa
iso GA_3	10-14	2659	M* 504 (100), 489 (16), 475 (36), 460 (9), 445 (22), 431 (16), 414 (8), 387 (13), 369 (14), 311 (12)
3-epi GA_1	17-18	2802	M* 506 (100), 491 (25), 459 (14), 448 (38), 376 (51), 313 (6), 208 (15), 207 (29)
GA_1	18-19	2669	M^+ 506 (100), 491 (9), 448 (23), 416 (6), 377 (15), 357 (8), 313 (7), 207 (12)
GA_3	18-19	2692	M* 504 (100), 489 (10), 475 (9), 460 (14), 445 (14), 431 (12), 387 (15), 370 (18), 355 (12), 311 (13), 208 (22)
GA_{20}	25 - 26	2549	M* 418 (16), 403 (16), 390 (10), 375 (54), 359 (15), 343 (8), 301 (10), 207 (16)
GA_4	29-30	2569	M 418 (16), 386 (27), 358 (12), 328 (26), 284 (100)*, 261(12), 225 (54), 224 (96)

Tabla 7.XII. Identificación de los MeTMSi derivados de las GAs mediante el análisis combinado de cromatografía de gases y espectrometría de masas en medio de cultivo de *B. licheniformis*

GA	Fracción HPLC	KRI	Ion (m/z) y abundancia relativa
iso GA_3	10-14	2659	504 (100), 489 (17), 475 (22), 460 (6), 445 (10), 431 (5), 414 (3), 387 (4), 369 (6), 311 (4)
GA_1	18-19	2669	M^+ 506(100), 491 (37), 448 (13), 416 (3), 377 (11), 357 (5), 313 (6), 207 (4)
GA_3	18-19	2692	M*504 (100), 489 (55), 475 (4), 460 (15), 445 (4), 431 (4), 370 (6), 355 (10), 311 (6)
GA_{20}	25 - 26	2549	418 (47), 403 (17), 390 (16), *375 (100), 359 (44), 343 (15), 301 (28), 207 (50)
GA_4	29-30	2569	418 (18), 386 (25), 358 (11), 328 (30), *284 (100), 261 (7), 225 (44), 224 (74), 201(17)

En la figura 7.6. aparece el espectro de masas de MeTMSi-GA_1 de una muestra de medio de cultivo de *B. pumilus*.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Figura 7.6. Espectro de masas de MeTMSi-GA_1 de una muestra de medio de cultivo de *B. pumilus* .

En la Figura 7.7. aparecen los cromatogramas de masas de la corriente iónica producida por los iones 506 y 508 seleccionados para la cuantificación de GA_1 en la fracción 17-19 de un extracto del medio de cultivo de *B. pumilus*.

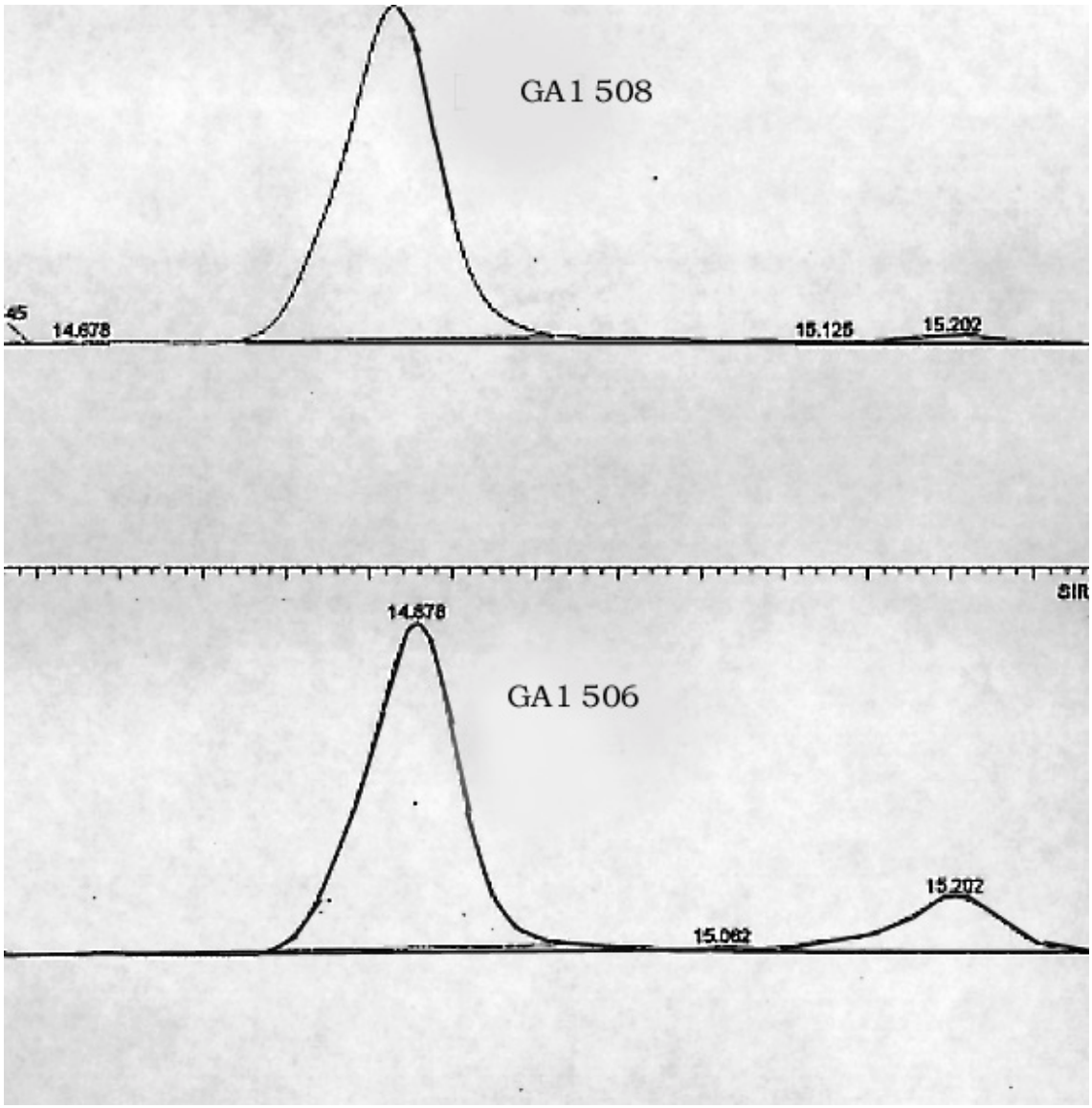


Figura 7.7. Cromatograma de masas de la corriente iónica producida por los iones 506 y 508 seleccionados para la cuantificación de GA_1 en la fracción 17-19 de un extracto de medio de cultivo de *B. pumilus* (A).

Por último, los resultados de la cuantificación de giberelinas producidas por ambas bacterias en los medios de cultivo estériles, tras 24 h de agitación a 28 ºC, en los que se alcanzó la fase estacionaria, con una densidad de microrganismos de 10^8 ufc/mL, aparecen en la tabla 7.XIII. La presencia de epi-GA1 en el medio de cultivo de *B. licheniformis* es escasa, lo que no permite su identificación previa con exactitud; sin embargo, la cuantificación de esta giberelina en el medio de cultivo, indica que sí existe.

Tabla 7.XIII. Cuantificación de las giberelinas presentes en los medios de cultivo bacterianos procedentes de *B. pumilus* y *B. licheniformis*

GA (ng/mL)	*B. pumilus*	*B. licheniformis*
GA_1	148,79	123,2
epi GA_1	10,07	3,71
GA_3	50,96	57,12
iso GA_3	18,12	11,38
GA_4	11,24	7,76
GA_{20}	2,93	1,70

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

8. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GIBERELINAS POR *B. pumilus* Y *B. licheniformis*

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

En esta parte de la presente Memoria, se han realizado pruebas biológicas dirigidas a la detección de hormonas del tipo giberelina en los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis*. Como ya se ha señalado anteriormente, la aplicación de los medios de cultivo de estas bacterias sobre el sustrato en el que crecían plántulas de aliso, planta de la que fueron aisladas, provoca extraordinarios incrementos en el crecimiento de la parte aérea (Probanza *et al.*, 1996). En los medios de cultivo se detectaron compuestos de tipo auxínico (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996) a los que se atribuyeron las modificaciones observadas en el crecimiento y desarrollo del sistema radical (aumento en el cociente superficie radical / longitud radical). Esta alteración pudo ser en parte responsable del mayor crecimiento de la parte aérea, debido al aumento de superficie del sistema radical que repercutiría en una mejora de la nutrición mineral al aumentar la superficie de absorción. Sin embargo, los incrementos de longitud del sistema aéreo fueron muy acusados y ocurrieron en un intervalo de tiempo que nos indujo a considerar la existencia de compuestos con actividad hormonal del tipo giberelina, que absorbidos a nivel radical, ejercen su efecto en la parte aérea.

En primer lugar, se ha realizado un ensayo biológico típico para la detección de este tipo de hormonas (Reeve y Crozier, 1975). Puesto que uno de los procesos regulados por las giberelinas endógenas es la elongación internodal, se aplicaron los medios de cultivo de ambas bacterias por separado en distintas concentraciones así como suspensiones de GA_3, también en distintas concentraciones, sobre los ápices caulinares de las plántulas de aliso enanas. Estas plantas habían sido previamente enanizadas mediante aplicación de paclobutrazol (PCB) (Rademacher, 1991). Este compuesto es un inhibidor de la síntesis de giberelinas en la segunda etapa, un grupo de oxidaciones sucesivas que rinden la primera giberelina, la GA_{12}-aldehido, precursora de todas las demás. En estas oxidaciones están implicadas monooxigenasas que utilizan el citocromo P450, y que son las que se ven afectadas por el PCB (Davies, 1998). La reversión de la enanización causada por el PCB es una de las evidencias más sólidas de la presencia de giberelinas. En las pruebas biológicas tradicionales, los ensayos se realizan sobre plantas de maíz enanas, pero en este caso, puesto que la planta de la que se aislaron las bacterias fue el aliso, una leñosa, se realizó el ensayo sobre ejemplares enanos de la planta madre.

Los resultados obtenidos en las pruebas biológicas revelaron la presencia de hormonas de tipo giberelina en los medios de cultivo, por lo que se procedió al análisis de éstos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Actualmente, esta metodología es la única que puede aportar las pruebas necesarias para demostrar la existencia de giberelinas debido a que aparecen en concentraciones del orden de picogramos/L y su espectro de absorción no permite el empleo de los detectores habituales en HPLC.

Una vez transcurrido el tiempo determinado para las pruebas biológicas, las plántulas se prensaron y se midió la longitud aérea, longitud del brote inducido por la aplicación de los medios de cultivo o de las soluciones de GA_3, superficie aérea, superficie del brote, longitud radical y

superficie radical, y se contó el número de hojas del brote. Para evaluar si los tratamientos habían tenido efecto y su eficacia, se realizaron ANOVAs en todos los casos, evaluando la significación de las diferencias mediante LSD, en aquellos casos en que éstas resultaron significativas. Con los datos experimentales se trazaron rectas de regresión y se calcularon los coeficientes de correlación correspondientes.

Los parámetros radicales no se vieron afectados por la aplicación de ningún tratamiento, lo que indica que la ruta de transducción de la señal requerida para el crecimiento inducido por las giberelinas probablemente no se expresa en la raíz (Davies, 1998). No obstante, este mismo autor no descarta que pueda existir síntesis de giberelinas en la raíz puesto que se han detectado en los exudados. Sin embargo, el sistema radical reflejó la aplicación del inhibidor de la síntesis de giberelinas utilizado, el paclobutrazol (PCB), apareciendo las raíces mucho más cortas y anchas, a pesar de que la exposición al PCB se hizo durante un periodo de tiempo corto, y se eliminó completamente al final de ese tiempo al renovar el soporte de crecimiento (vermiculita).

En cuanto a los parámetros aéreos podemos afirmar que en todos los casos se detectó una respuesta al tratamiento, tanto con GA_3 como con los medios de cultivo de *B. pumilus* y *B. licheniformis*. La longitud aérea (Tabla 7.I) se ve muy afectada por el PCB lo que se refleja en que los controles enanos alcanzan una longitud total, que es aproximadamente la mitad que una planta normal de la misma edad. Además, presenta un aspecto diferente, con un tallo más grueso y consistente, color más oscuro y un acusado acortamiento de la distancia internodal, que se evidencia en el agolpamiento de las hojas en un punto. La respuesta a los tratamientos se correlaciona positivamente con la concentración de GAs o de los medios de cultivo, ajustándose a una recta con coeficientes de correlación elevados (Figura 7.3). En este caso, el tratamiento más efectivo es el de GA_3, y los valores totales alcanzados igualan los de plantas normales, si bien la planta presenta un aspecto muy diferente, con el porte achaparrado de la planta enana, y un brote excesivamente largo, fino y con un número de hojas variable de un color más claro, aspecto ya descrito por otros autores tras la aplicación exógena de giberelinas (Davies, 1998).

La aplicación de los medios de cultivo bacterianos en concentraciones crecientes también muestra una relación lineal con la elongación; sin embargo, en este caso, la respuesta es menor que frente a GA_3, y presenta ligeras diferencias entre ambos tratamientos (Figuras 7.1. y 7.2). Podemos comparar la respuesta de los medios x20, y se observa que *B. licheniformis* obtiene resultados significativamente mayores que *B. pumilus* con respecto a sus controles, lo que desaparece prácticamente al aplicarlos x80. Estos resultados revelan un efecto diferencial de ambos medios de cultivo y sugieren la existencia de diferencias cualitativas o cuantitativas en el perfil de giberelinas sintetizados por las bacterias. Además, la intensidad de la respuesta a los medios 80x oscila entre la que se obtiene con 5 y 20 $\mu g\ mL^{-1}$ de GA_3, lo que puede dar una idea de las concentraciones en las que se encuentran las giberelinas en los medios de cultivo, aunque

evidentemente se trata de una metodología de aproximación a partir de la cual es muy arriesgado obtener conclusiones.

Los resultados obtenidos en las medidas de longitud y superficie del brote se tratraron de la misma forma. Considerando los resultados obtenidos en los análisis de longitud aérea total en los que se relacionaba la intensidad del efecto del medio 80x con el efecto y concentración de la solución de GA_3 entre 5 y 20 ppm, esperaríamos una elongación del brote similar a la obtenida con ambos tratamientos. Sin embargo, los medios de cultivo concentrados 80 veces tenían una respuesta más acusada que la de 5 $\mu g\ mL^{-1}$ de GA_3, lo que habla de que el perfil de giberelinas producidas por las bacterias es más activo que la GA_3 aplicada de forma individual. Además, las rectas de regresión (Figura 7.4) trazadas a partir de los resultados obtenidos con ambos medios de cultivo presentan unos ajustes mejores que los obtenidos con GA_3, y en el caso del medio de *B. pumilus*, es mejor en el brote que en la longitud total. Estos resultados confirman lo ya expuesto al estudiar la longitud aérea total con respecto a la comparación cualitativa y cuantitativa de las giberelinas presentes en los medios de cultivo. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos experimentos muestran diferencias más acusadas que en el caso anterior, lo que sugiere que antes de la activación del meristemo apical lateral, responsable del crecimiento del brote, se produce una activación del meristemo apical principal, responsable del crecimiento de la parte anterior de la planta, aunque este efecto es mucho menor que sobre el brote lateral.

Como se puede apreciar a partir de los resultados obtenidos en este bioensayo, el incremento en longitud, bien total o del brote, ocurre por un alargamiento de los entrenudos, efecto típico de compuestos con actividad giberelina. Este efecto se debe a la activación de la división celular en zonas subapicales, dando lugar a una nueva región meristemática (meristemo subapical).

En cuanto a la superficie del brote, los resultados indican que son mucho más efectivos los tratamientos de cualquiera de los medios de cultivo bacterianos concentrados que el de GA_3, obteniéndose además unos ajustes mucho mejores que con ésta (Figura 7.5). En este caso hay que tener en cuenta el llamativo incremento en longitud alcanzado bajo la influencia de GA_3, lo que provocaba un tallo ahilado, con pocas hojas, finas y cloróticas, hechos que en conjunto conducen a una superficie aérea menor. Por el contrario, bajo la influencia de las bacterias, la elongación era menor que con GA_3, y además las hojas presentaban mejor aspecto, más anchas , fuertes y de un verde más intenso, lo que resulta en una mejor correlación con la superficie. Este hecho corrobora lo ya señalado en el caso de la longitud del brote, indicando una actividad más equilibrada de las giberelinas bacterianas frente a la giberelina sintética.

Los datos de superficie aérea total confirman de nuevo que los medios de cultivo tienen una mayor influencia en el aumento de superficie que la GA_3, y que son igual de efectivos, alcanzándose valores similares cuando se aplican en la máxima concentración, aunque el ajuste

de la recta de regresión obtenida con *B. licheniformis* es mucho mejor que el de *B. pumilus*. Esto indica de nuevo la diferente composición cualitativa y cuantitativa entre los medios de cultivo, que ya hemos señalado anteriormente. Por otra parte, el efecto de la aplicación de los medios de cultivo sobre la superficie total mantiene la misma proporción cuando se considera con respecto a la superficie del brote, lo que indica que el efecto ocurre prácticamente en exclusividad en el brote y no en la parte anterior del mismo, como ocurría en la longitud aérea total, en la que también se veía afectada la parte anterior del mismo.

El análisis por GC-MS reveló la presencia de 4 giberelinas distintas y dos isómeros en ambos medios de cultivo (Tablas 7.XI y 7.XII), si bien estaban presentes en distintas concentraciones (Tabla 7.XIII). Entre las giberelinas identificadas se encuentran la GA_1, epi GA_1, GA_3, isoGA_3, GA_4 y GA_{20}, todas ellas son giberelinas C19, lo que hasta la fecha, parece ser característico de las bacterias PGPRs capaces de sintetizar este tipo de compuestos (Rademacher, 1994). Por ejemplo, *Rhizobium phaseoli* produce GA_1, GA_4, GA_9 y GA_{20} (Atzorn *et al*., 1988), *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicaea* generan GA_1 y GA_3 (Bottini *et al*, 1989; Bastián *et al*, 1998). Por tanto, todas las giberelinas identificadas en los medios de cultivo de *B.pumilus* y *B.licheniformis* (Tablas 7.XI y 7.XII) son activas (GA_1, GA_3, GA_4) o potencialmente activas (epi GA_1, isoGA_3 y GA_{20}). Una hidroxilación 3β de la GA_{20}, la transforma en GA_1. La isoGA_3, que presenta una actividad de 1/6 o 1/10 que la GA_3 (Hoad *et al.*,, 1976), puede aparecer por descomposición de la muestra en solución acuosa (Pryce, 1973), o consecuencia de la manipulación de la muestra en condiciones básicas (Takahashi,. 1986), considerándose por lo general como un artefacto (Moore *et al*, 1986). En este sentido, nuestros resultados corroboran los de otros autores (Bottini *et al.*, 1989), que trabajando en condiciones ácidas, atribuyen la presencia de la isoGA_3 exclusivamente al metabolismo bacteriano. La epiGA_1, un epímero de la GA_1 que se forma durante la síntesis por un fallo en el enzima responsable, y su presencia se ha detectado en extractos de tejidos vegetales (Gaskin *et al*., 1995). No obstante, este epímero se puede formar durante la extracción, purificación y análisis de GC-MS, a partir de la GA_1, lo que plantea dudas con respecto a su origen: es un artefacto o ha sido sintetizado por la bacteria. En este sentido, en la cuantificación de GA_1 y epiGA_1 se ha utilizado el isótopo estable de la GA_1, según proponen Ben-Cheikh *et al* (1997), y los resultados indican que el origen de este epímero es artefactual. Además, estos mismos autores indican que el origen de la epiGA_1 puede ocurrir por isomerización de la GA_1 durante la inyección, lo que ocurre de forma aleatoria.

De todas las giberelinas identificadas, la GA_1 es la más activa y parece ejercer el control de la elongación caulinar en la mayoría de las especies (Davies, 1998), habiéndose demostrado en guisante (Ingram *et al.*, 1986 ; Davies, 1995) y en maíz (Phinney, 1985). Este control también se ha descrito en plantas en roseta (Sachs *et al.*, 1959). En este sentido, Talón *et al.*, (1991), detectan un considerable incremento de hasta 30 veces en los niveles de

GA_1 en las zonas meristemáticas subapicales, en *Silene armeria*. Por otra parte, Davies (1988) no descarta la posibilidad de que existan otras giberelinas también activas características de cada planta o tejido, como por ejemplo la GA_3, que se diferencia de la GA_1 solamente en un doble enlace, es poco frecuente en las plantas superiores, y sin embargo, es capaz de producir el mismo efecto que la GA_1 en pruebas biológicas. También se ha demostrado que la GA_4, presente en la familia Cucurbitaceae, es tan activa o más que la GA_1 al menos en determinadas especies (Kobayashi *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1997).

Estos datos son especialmente importantes, ya que las giberelinas más abundantes en los medios de cultivo de ambas bacterias son GA_1 y GA_3. Las diferentes concentraciones de ambas formas en los medios de cultivo deben ser las responsables de las diferencias encontradas en las pruebas biológicas en las que *B. licheniformis* es más efectivo en bajas concentraciones, equilibrándose el efecto de ambas bacterias en la máxima concentración. *B. pumilus* presenta unos valores más altos en longitud y superficie del brote, junto con unos ajustes mejores, mientras que considerando la longitud y superficie totales, es *B. licheniformis* el que obtiene mejores resultados, provocando incrementos más equilibrados en la planta.

Desde el punto de vista fisiológico, *B. pumilus* produce mayor cantidad de giberelinas que *B. licheniformis*, especialmente en lo que respecta a GA_1, por lo que desde este punto de vista, *B. pumilus* puede presentar mayor actividad como PGPR. Sin embargo, los resultados obtenidos en el Apartado 3 de esta Memoria indican que las condiciones en las que se desarrolla la bacteria afectan a su capacidad PGPR, capacidad que viene principalmente condicionada por el sustrato. Por tanto, el uso de esta cepa como biofertilizante se vería bastante limitado por el sustrato donde fuera a aplicarse, mientras que la aplicación de *B. licheniformis* resultaría a priori mejor.

Hasta la fecha, la obtención de giberelinas se consigue de dos formas, por síntesis química o por fermentación a partir de cepas de *Gibberella fujikuroi*. La síntesis química es un proceso muy costoso, y las GAs obtenidas por esta vía se destinan principalmente a la investigación. La fermentación es la forma tradicional de obtener giberelinas para uso industrial, a partir de cepas seleccionadas de *Gibberella fujikuroi*, que produce principalmente GA_3, junto con una mezcla de GA_4 y GA_7 difícil de separar y purificar. Además, este proceso tiene lugar en un periodo de tiempo largo, entre 15 y 18 días, y depende de los sustratos utilizados y del tipo de fermentación (Borrow *et al.*,, 1955), con unos rendimientos que oscilan entre los 0.04 g L^{-1} y 0.2 g L^{-1}. Estudios recientes (Graebbe y Rademacher, 1980) han demostrado la capacidad de otro hongo *Sphaceloma manihoticola* (DSM 1638), de producir giberelinas, con un rendimiento de GA_4 especialmente elevado, hasta 7 mg L^{-1}, junto con otras giberelinas, GA_9, GA_{13}, GA_{14}, GA_{15}, GA_{25}, GA_{36} y GA_{37}, que se producen en menores cantidades. No obstante, el período de incubación para la obtención de este rendimiento es de 25 días. La producción de este tipo de hormonas por otras cepas bacterianas se limita a *Azospirillum lipoferum* (Bottini *et al.*,, 1989),

que en medio de cultivo líquido obtiene unos rendimientos de 20 a 40 ng L^{-1}, de GA_1, GA_3 e iso-GA_3 y, como se ha dicho anteriormente, *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicaea* sintetizan GA_1 y GA_3 en cultivo líquido (Bastián *et al*, 1998) en cantidades similares (15 ng L^{-1})

En vista de nuestros resultados de cuantificación (Tabla 7.XIII) y de los datos experimentales, otro uso derivado de estas cepas PGPRs es la producción industrial de giberelinas. Las elevadas concentraciones en las que se detectan estas hormonas en los medios de cultivo, y sobre todo, el hecho de que se produzcan giberelinas activas, distintas de la GA_3, invitan a profundizar en este aspecto.

La utilización de estas cepas como productoras de giberelinas resultaría muy rentable puesto que se alcanzan niveles de GA_1 y GA_3 alrededor de los 150 y 50 μg L^{-1}, respectivamente, y lo que es más importante, en un período de 24 h. Esto hace que el rendimiento de la producción bacteriana sea mucho mayor que la fúngica, haciendo interesante el estudio de producción de GA_4 y GA_{20}, que están en menor concentración en los medios de cultivo.

El estudio de la producción bacteriana de giberelinas resulta de gran importancia, ya que se podrían reducir los costes de fabricación de giberelinas utilizadas en actividades tan importantes para la economía nacional como el manejo de cítricos, la producción de planta ornamental o la aceleración del malteado de la cerveza, como ya se ha comentado en la introducción.

9. CONCLUSIONES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1. La metodología empleada para determinar la capacidad de colonización del inóculo y las alteraciones que éste produce en las comunidades rizobacterianas, permite detectar claras diferencias en el comportamiento de las comunidades en función del tipo de suelo, mostrándose éste como un factor determinante de la evolución del inóculo y de las alteraciones producidas por la inoculación.

2. La inoculación de *B. licheniformis* provoca una alteración duradera en las poblaciones viables y cultivables que indica su capacidad para colonizar la rizosfera de *A. glutinosa* en todos los suelos ensayados. *B. pumilus* sólo demuestra esta capacidad de colonización en el suelo de origen.

3. La inoculación de *B. licheniformis* no provoca a largo plazo alteraciones significativas en la estructura de las poblaciones bacterianas rizosféricas. Sin embargo, sí existe alteración cuando la inoculación se realiza con *B. pumilus*, si el sustrato es distinto al de procedencia de las cepas bacterianas ensayadas.

4. Los experimentos realizados sobre soporte estéril demuestran que, además de las características fisicoquímicas del sustrato, la interacción entre el inóculo y las comunidades rizobacterianas presentes en él pueden alterar la evolución y capacidad de colonización del mismo.

5. Ambas cepas provocan importantes alteraciones en el crecimiento de *A. glutinosa*. Dichas alteraciones son más acusadas en el suelo de origen y se concretan en un mayor crecimiento de la planta durante el período evaluado. Cuando el sustrato no es el de origen, los efectos se concretan fundamentalmente sobre el sistema radical de las plantas.

6. Los ensayos realizados sobre turba-arena demuestran la capacidad de ambas cepas para alterar el crecimiento vegetal en dos especies diferentes, tanto de la planta de la que fueron aisladas, *A. glutinosa*, como de otra leñosa, *Pinus pinea*.

7. Las alteraciones fisicoquímicas detectadas en el sistema rizosférico de *A. glutinosa*, así como la alteración de la exudación radical indican una fuerte influencia de la inoculación sobre la actividad fisiológica de la planta, especialmente bajo el efecto de *B. licheniformis.*

8. Ambas cepas producen en el medio de cultivo giberelinas del tipo C19: GA_1, GA_3, GA_4 y GA_{20} en cantidades del orden de mg/L, la más abundante fue la GA_1. Dicha producción se detectó a las 24 h de incubación en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

9. La aplicación del medio de cultivo bacteriano sobre el ápice caulinar de plantas enanizadas, induce un crecimiento del sistema aéreo en el que no se aprecia un desequilibrio entre el alargamiento de los entrenudos y el desarrollo de la superficie foliar.

10. Los niveles de producción de giberelinas por ambas cepas, así como los tipos de giberelinas producidas justifican su uso para la obtención de giberelinas a gran escala. Como consecuencia de la producción de hormonas, de su capacidad de colonización y de su actividad sobre otra especie distinta de la que fueron aisladas, las dos cepas ensayadas pueden ser consideradas como PGPRs y ser empleadas como biofertilizantes.

10. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ABROSIMOVA, L.M. y REVUT, I.B. 1964. Biological activity and the composition of soil air in the plow layer. *Soviet Soil Science,* 7:682-691.
ACERO, N., PROBANZA, A., BLANCO, B. y GUTIERREZ MAÑERO, F.J. 1994. Seasonal changes in physiological groups of bacteria that participate in nitrogen cycle in the rhizosphere of alder. *Geomicrobiol. J.,* 12:133-140.
ALEXANDER, M. 1977. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, New York.
ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Ed. S.A. Mexico.
ALSTRÓM, S., 1987. Influence of root-zone inhabiting bacterias on growth of plants and soil-borne fungal pathogens. Tesis Doctoral. Swedish Institute of Agricultural Sciences. Upsala.
ANDRADE, G., DE LEIJ, FAAM, LYNCH, J.M., 1998. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. *Letters in appl.microbiol*., 26:311-316.
ANDRADE, G., MIHARA, K.L., LINDERMAN, R.G., BETHELENFALVAY, G.J., 1997. Bacterial from rhizosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. Plant Soil 192:71-79.
ANDREEVA I.N., REDKINA, T.V., IZMALIOV, S.F., 1993. The involvement of indoleacetic acid in th estimulation of Rhizobium-legume symbiosis by *Azospirillum brasilensis*. *Russian J.Pl Phys* 40(6):901-906.
ARTECA, R.N., 1996. Plant Growth Substances. Principles and Applications. Chapman & Hall, eds. New York, NY 10003.pp: 332
ASANUMA, S., TANAKA, H. y YATAZAWA, M. 1979. Rhizoplane micro-organisms of rice seedlings as examined by scanning electron microscopy. *Soil Science and Plant Nutrition*, 25:539-551.
ATZORN, R., CROZIER, A., WHEELER, C.T. y sandberg, g. 1988. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* 175: 532-538.
AYERS, W.A. Y THORTON, R,H. 1968. Exudation of aminoacids by intact and damaged roots of wheat and peas. *Plant and Soil*, 28: 193-207.
BÅÅTH, E., FROSTEGÅRD, A., PENNANEN, T. Y FRITZE, H. 1995. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biol. Biochem.,* 27(2): 229-240.
BAKKER, A.W. y SCHIPPERS, B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp*-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem*., 19: 451-457.
BARBER, D.A. y MARTIN, J.K. 1976. The release of organic substances by cereal roots into soil. *New Phytol.* 76: 69-80.
BAR-NESS, E., CHEN, Y., HADAR, Y., MARSCHNER, H. y RÖMHELD, V. 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *En*: Iron Nutrition and Interactions in Plants, (Y.Chen y Y.Hadar, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 271-281.
BASHAN, J., HOLGUIN, G., 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classificatons: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol.Biochem*. 30(8/9):1225-1228.
BASHAN, Y, 1998. *Azospirillum* palnt growht-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can.J.Microbiol*. 44:168-174.
BASHAN, Y. y LEVANONY, H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol*., 36:591-608.
BASHAN, Y., HOLGIN, G., LIFSHITZ, R., 1993. Isolation and characterizaton of plant growth promoting rhizobacteria. *En*: Glick, B.r, and Thopson J.E.(eds). Methods in plant molecular biology and biotechnology. Boca Raton, Florida, CRC press pp. 331-345.
BASTIÁN, F., COHEN, A., PICCOLI, P., LUNA, V., BARALDI, R. y BOTTINI, R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A_1 and A_3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24: 7-11.
BATTEN, D.J., y GOODWIN, P.B., 1978. Phytohormones and te induction of adventitious roots . *En*: Phytohormones and related compounds- A camprehensive trateis. Vol 2. Eds, D.S.Letham, P.B.Goodwin, y F.J.V.Higgins. Elsevier/Northe Holland Biomedical Press, Amsterdam pp 137-173.
BEN-CHEIKH W, PEREZ-BOTELLA, J, TADEO FR, TALON M, PRIMO-MILLO E (1997) Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiol* 114: 557-564

BENHAMOU, N., BÉLANGER, R.R. y PAULITZ, T.C. 1996. Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-Transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxyporum* f. sp. pisi and *Pythium ultimum*. *Phytopathology* Vol. 86 Nº 11: 1174-1185.
BENT, E., y CHANWAY, C.P., 1998. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Can.J.Microbiol*. 44(10):980-988
BERMÚDEZ DE CASTRO, F. y GUTIERREZ MAÑERO, F.J. 1987. Introducción de *Myrica gale* L. en un pastizal. Respuesta de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. *Studia Oecologica*, 4:150-156.
BLAMEY, F.P.C., EDMEADES, D.C., ASHER, C.J., EDWARDS, D.G. y WHEELER, D.M. 1991. Evaluation of solution culture techniques for studying aluminium toxicity in plants. En: Plant-Soil Interactions at Low pH (R.J. Wright, V.C. Baligar and R.P. Murrmann, eds.). Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands. pp. 905-912.
BLIGH, E.O. y DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipide extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-920.
BOLAN, N.S., TOBSON, A.D., BARROW, N.J., 1987. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the availability of iron phosphates to plants. *Plant Soil* 99:401-410.
BOLLEN, W.B. y LU, K.C. 1968. Nitrogen transformations in soils beneath red alder and conifers. *En*: Biology of Alder, (J.M. Trappe, J.F. Franklin, R.F. Tarrant y G.M. Hansen, eds.) U.S. Dep. Agric. For. Serv. Portland. Oregon. 141-148 pp.
BOLTON, H., ELLIOTT, L.F., GURUSIDDIAH, S. y FREDRICKSON, J.K., 1989. Characterisation of a toxin produced by a rhizobacterial *Pseudomonas* sp. that inhibits wheat growth. *Plant and Soil,* 114:279-287.
BORROW, A., BRIAN, P.W., CHASTER, V.E., CURTIS, P.J.,HEMMING, G.F., HENEHAN,C., JEFFERYS, E.G., LLOYD, P.B., NIXON, I.S., NORRIS, G.L.F., AND RADLEY, M., 1955. *J.Sci.Food Agric*, 6:340-348.
BORROW, JA., BRIAN, P.W., CHESTER, V.E., CURTIS, P.J., HEMMING, J.G., HENEHAN, C., JEFFERYS, E.G., LLOYD, P.B., NIXON, I.S., NORRIS, G.L.F., RADLEY, M., 1955. Microbial production of gibberellins. *J.Sci. Food Agric*., 6:340-348.
BOTTINI, R., FULCHIERI, M. PEARCE, D. y PHARIS, R.P. 1989. Identification of gibberelins A_1, A_3, and ISO-A_3, in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol*., 90: 45-47.
BOWEN, G.D. 1979. Integrated and experimental approaches to study the growth of organisms around root and seeds. *En*: Soil Borne Pathogens.Academic Press, (B.Schippers and W.Gams, eds). London. 209-227 pp.
BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. *En*: Plant Roots-The Hidden Half, (Y. Waisel, A. Eshel y U. Kafkafi, eds.). Marcel-Dekker, Nueva York. 641-649 pp.
BOWEN, G.D., 1969. Nutrients status effects on loss of amides and amino acids from pine roots. Plant Soil, 30:139-142.
BRIAN, P.E., WRIGHT, J.M., STUBBS, J. y WAY, A.W., 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plants. *Nature,* 167: 347-349.
BROWN, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol.,* 12: 181-197.
BROWN, M.E., 1974. Seed and root bacterization. *Annu.Rev.Phytopatol*. 12:181-197.
BURR, T.J. y CAESAR, A. 1984. Beneficial plant bacteria. *Critical Rev. Plant*. Sci., 2: 1-20.
BUYANOVSKY, G.A. y WAGNER, G.H. 1983. Annual cycles of carbon disoxide level in soil air. *Soil Sci. Soc. Am. J*., 47: 1139-1145.
CAMPBELL, R. y GREAVES, M.P. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. En: The Rhizosphere. J.M. Lynch (de.), John Wiley & Sons Ltd, Essex. pp 11-34.
CHANDWICK, A.V. y BURG, S.P. 1987. An explanation of the inhibition of growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol*., 42: 415-420.
CHANWAY, C.P. y NELSON, L.M., 1991. Characterization of cultivar specific growth promotion of spring wheat by Bacillus sp. *En*: The Rhizosphere and Plant Growth, (D.L.Keister y P.B. Cregan, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. 365 pp.
CHANWAY, C.P., 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science*, 43(1):99-112.
CHANWAY, C.P., HOLL, F.B. y TURKINGTON, R. 1988a. Genotypic coadaptation in growth promotion of forage species by *Bacillus polymixa*. *Plant and Soil,* 106: 281-284.
CHANWAY, C.P., NELSON, L.M. y HOLL, F.B. 1988b. Cultivar specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by co-existent *Bacillus* species. *Can J. Microbiol*., 34: 925-929.
CHANWAY, C.P., y HOLL, F.B., 1993. Ecotypic specificity of spruce emergence-stimulating *Pseudomonas putida*. For Sci 39:520-527.

CHHONKAR, P.K. y TARAFDAR, J.C. 1981. Characteristics and localissation of phosphatases in soil-plant system. *J. Indian Soc. Soil Sci*., 29: 215-219.
CHRISPEELS, M.J., y VARNER, J.E., 1967. Hormonal control of enzyme synthesis: on the mode of action of gibberellic acid and abscisin in aleurone layers of barley. Plant physiology 42:1008-1016.
CHUNG, J.B. y ZASOSKI, R.J. 1994. Ammonium-potassium and ammonium-calcium exchange equilibria in bulk and rhizosphere soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 1368-1375.
CLARHOLM, M. 1985a. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. Biochem*., 17: 181-187.
COOK, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol*., 31: 53-80.
COWLING, E.B. y MERRIL, W. 1966. Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. *Can. J. Bot.,* 44: 1539-1554.
CROWLEY, D.E., REID, C.P.P. y SZANISZLO, P.J. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.,* 87: 680-685.
CURL, E.A. y TRUELOVE B. 1986. The rizosphere. Advanced series in agricultural sciences, 15. D.F.R. Bommer, B.R. Sabey, Y. Vaadia, G.W. Thomas y L.D. Van Vleck (eds.). Spriger-Verlag. Berlin. 280 pp.
DAVIES, P.J., 1995. The plant hormone concept: concentration sensitivity and transport. *En*: Plant Hormones: physiologý, biochemistry and Molecular Biology, P.J.Davies, ed., Kluwer, Boston,pp 13-38.
DAVIES, PJ, 1998. Gibberellins. *En*: Plant Physiology. Taiz, L, Zeiger, E, 1998.. Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 1998, pp 591-619.
DAVISON, J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Biotechnology*, 6: 282-286.
DAY, P.R. 1965. Particle fractionation and particle-size analysis. *En*: Methodos of Soil Analysis. *Am.Soc.Agron*. Part 1. 545-567 pp.
DE FREITAS, J.R., GUPTA, V.V.S.R. y GERMIDA, J.J. 1993. Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *P.putida* R105 on the growth and N_2 fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biol. Fertil. Soils,* 16: 215-220.
DE LEIJ, F.A.A.M., WHIPPS, J.M., LYNCH, J.J., 1995. Traditional methods of detecting and selecting functionally important microorganisms from the soil and the rhizospehre. *En*: Allsopp. D., colwll, R.R., Hawkswirth, D.L. (eds), Microbial Diversity, Ecosystem Function, CAB Intenational, pp 321-326.
DELHAIZE, E., PYAN, JP.R. y RANDALL, P.J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.)II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol*., 103: 695-702.
DEVLIEGHER, W., SYAMSUL ARIF,M.A. y VERSTRAETE, W. 1995. Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol*. 61(11): 3865-3871.
DINKELAKER, B. y MARSCHNER, H. 1992. In vivo demonstration of acid phophatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. *Plant and Soil* 144: 199-205.
DOBEREINER, J. Y H.DE-POLLI, 1980. Diazotrophic rhizocoenosis. P 301-333. *En*: Nitrogen fixation Proc. of phytochem Soc. Eur. Symp. No 18 Stewart, W.D.P. and J.R. Gallon (eds).Academic Press, London.
DOKE, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the response of potato tuber tissues to infetion with and imcompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal cell wall components. *Physiol. Plant Pathol.,* 23: 345-357.
DOYLE, J.D., STOTZKY, G, 1993. Methods for the detection of changes in the microbial ecology of soil caused by the introduction of microorganisms. *Microbial Rel*., 2:63-72
DUCHAUFOUR, P. 1978. Manual de edafología. Ed: Toray-Masson. 118 pp.
ELLIOTT, L.F. y LYNCH, J.M. 1985. Plant growth inhibitory pseudomonads colonising winter wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant and Soil,* 84: 57-65.
ELMERICH, C. 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Biotechnol*. 2: 967-978.
ENEBAK, S.A., WEI, G, KLOEPPER, J.W., 1997. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Science*, 44(1):139-144.
ESASHI, Y. 1991. Ethylene and seed germination. *En:* The Plant Hormone Ethylene, (A.K.Matoo, J.C.Suttle, eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 133-157 pp.
FORSTER, 1995. Organic matter determination. *En*: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Kassem Alef and Paolo Nannipieri (eds.).
FORSTER, S.M. 1990. The role of microorganisms in aggregate formation and soil stabilization: types of aggregation. *Arid Soil Res. Rehab*., 4: 85-98.
FRANKENBERGER, W.T., Jr, POTH, M., 1987. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microibol*. 53:2908-2913

FREDRICKSON, J.K. y ELLIOTT, L.F. 1985. Effects on winter wheat seedling growth by toxin-producing rhizobacteria. *Plant and Soil*, 83: 399-409.
FROSTEGÅRD, Å., BÅÅTH, E. y TUNLID, A. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forest as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 25(6): 723-730.
FROSTEGÅRD, Å., TUNLID, A. y BÅÅTH, E. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* 14: 151-163.
FROSTEGARD, A., PETERSEN, S.O., BAATH, E., 1997. Dynamics of a microbial community associated with manure hot spots as revealed by phospholipid fatty acid analyses. *Appl. Environ.Microbiol* 63:2224-2231.
GARCIA DE SALOMONE, Y. y DÖBEREINER, J. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum inoculation*. *Biol. Fertil. Soils,* 21: 193-196.
GARCIA TREJO, A. 1981. Experimentos en microbiología del suelo. Cia. Ed. Continental S.A. Mexico D.F. 75 pp.
GARDNER, W.K., BARBER, D.A. y PARBERY, D.G. 1983. The acquistion of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by wich phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant and Soil*, 70: 107-127.
GASKIN P, MACMILLAN J (1991) GC-MS of the gibberellins and related compounds: methodology and a library of spectra. Gaskin P, MacMillan J (eds) Cantocks Enterprises Ltd, University of Bristol
GASKIN P, MACMILLAN J, SPRAY CL, SUZUKI Y, PHINNEY BO (1995) 3-EpiGibberellin A_1: Natural occurrence in plants and artefactual formation from gibberellin A_1. *Phytochemistry* 38: 1-4
GASKINS, M.H., ALBRECHT, S.L. y HUBBELL, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. *Agric. Ecosyst. Environ*., 12.
GEELS, F.P., LAMBERS, J.G., HOEKSTRA, O. y SCHIPPERS, B. 1986. Potato yield response to seed tuber bacterization in the field in various rotations. *Neth. J. Pl. Path*., 92: 257-272.
GERMIDA, J.J. y WALLEY, F.L. 1996. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biol. Fertil. Soils*, 23: 113-120.
GILBERT, G.S., PARKE, J.L., CLAYTON, M.K., HANDELSMAN, J. 1993. Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*, 74(3):840-854.
GIOVANETTI, M., AVIO, L., SBRANA, C., CITEERNESI, A.S. y LOGI, C. 1993b. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol.*, 124: 587-593.
GLICK, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol*., 41: 109-117.
GLICK, G.R., JACOBSON, C.B., SCHWARZE, M.M.K, y PASTERNAK, J.J., 1995. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Psedomonas putida* GA12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can.J.Microbiol* 40:911-915.
GODO, G.H. y REISENAUER, H.M. 1980. Plant soil effects on manganes availability. *Soil Sci. Soc.Am.J.,* 44: 993-995.
GRAEBBE, JE., RADEMACHER, V., 1980. Fermentation method for producing a plant growth modifying compound. European Patent Application nº 0 024951-A2.
GRANATO, T.C. y RAPER, C.D. 1989. Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *J. Exp. Bot.* 40: 263-275.
GRAY, J.X. y ROLFE, B.G.,1990. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol. Microbiol.,* 4: 1425-1431.
GRAYSTON, S.J., VAUGHAN, D. y JONES, D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol*., 5: 29-56.
GRIFFIN, G.J., HALE, M.G. y SHAY, F.J. 1976. Nature and quantity of sloughed organic matter produced by roots of axenic peanut plants. *Soil Biol. Biochem*., 8: 29-32.
GUTIERREZ MAÑERO, F.J., ACERO, N., LUCAS, J.A. y PROBANZA, A. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. II. Charaterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant and Soil*, 182: 67-74.
GUTIERREZ MAÑERO, F.J., POZUELO GONZALEZ, J.M., LUCAS, J.A. y PROBANZA, A. 1995. Effects of nodular extracts of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. on nitrogen fixation (Acetylene reduction assay) and denitrification in different soils. *Orsis*, 10: 17-23.
HØJBERG, O., BINNERUP, S.J. y SØRENSEN, J. 1996. Potential rates of ammonium oxidation, nitrite oxidation, nitrate reduction and denitrification in the young barley rhizosphere. *Soil Biol. Biochem*., 28(1): 47-54.

HALE, M.G., MOORE, L.D. y GRIFFIN, G.J. 1978. Root exudates and exudation. En: Interactions between non-pathogenic soil microorganism and plants. Y.R. Dommergues Y s.v. Krupa (eds.). Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam. pp. 163-203.
HAMLEN, T. LUKEZIC, F.L. y BLOOM, J.R. 1972. Influence of age and stage of development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnobiotic environment. *Can. J. Plant Sci*., 52: 633-642.
HANSEN, J., 1987. Stock plant lighting and adventitious root formation. Hort Scie. 22:746-749.
HARLEY, J.L. y SMITH, S.E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. Londres.
HARMAN, J.H. 1967. Modern factor analysis. 2nd de. Univ. Chicago Press. Chicago. 133 pp.
HARRIS, W.F., SANTANTONIO, D. y McGINTY, D. 1980. The dynamic below-ground ecosysem. *En*: Forests: Fresh Perspectives from Ecosystem Analysis, (R.H.Waring, ed.). Oregon State University Press, Corvallis. 119-129 pp.
HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES Jr, F.T., 1990. Plant propagation: principles and practices. Fifth edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
HATTORI, T., HATTORI, R. 1976. The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. CRC *Crit Rev.Microbiol*. 4:423-461.
HATZINGER, P.B., y ALEXANDER, M., 1994. Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. *Plant Soil* 158:211-222
HAÜSSLING, M. y MARSCHNER, H. 1989. Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphatase activity in the rhizosphere of 80-year old Norway spruce (*Picea abies* (L.)Karst.)trees. *Biol. Fertil. Soils*, 8: 128-133.
HECHT, U. y MOHR, H. 1990. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. *Physiol. Plant*., 78: 379-387.
HELAL, H.M., DRESSLER, A., 1989. Mobilization and turnover of soil phosphorus in the rhizosphere. *A. Pflanzenernär Bodenk* 152:175-180.
HOAD, G.V., PHARIS, R.P., RAILTON, ID., DURLEY, R.C., 1976. Activity of the aldehyde and alcohol of gibberellins A_{12} and A_{14},, two derivatives of gibberelllin A_{15} and four decomposition products of gibberellin A_3 in 13 plant bioassays. *Planta* 130:113-120.
HODGE, A., PATERSON, E., GRAYSTON, S.J., CAMPBELL, D., ORD, B.G. Y KILLHAM, K. 1998. Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO_2 enrichment. *Soil Biol. Biochem.* 30 (8/9): 1033-1043.
HOFFLAND, E. 1992. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilizatio of rock phosphate by rape. *Plant and Soil*, 140: 279-289.
HOLL, F.B., CHANWAY, C.P., TURKINGTON, R., RADLEY, R., 1988. Growth response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), white clover (*Trifolium repens*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) to inoculation with *Bacillus polymixa*. *Soil Biol.Biochem*. 20:19-24.
HOLL, F.B., y CHANWAY, C.P., 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J.Microbiol*. 38:303-308.
HORAN, D.P. y CHILVERS, G.A. 1990. Chemotropism-the key to extomycorrhizal formation? *New Phytol*., 116: 297-301.
HOWELL, C.R. y STIPANOVIC, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopatol*., 69: 480-482.
HOWELL, H.W. y STIPANOVIC, R.D. 1980. Suppresion of *Phytium ultimum*-induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathol.*, 70: 712-715 .
HUNT, H.W., INGHAM, E.R., COLEMAN, D.C. y REID, C.P.P. 1988. Nitrogen limitation of production and decomposition in prairie, mountain meadow and pine forest. *Ecol.*, 69: 1009-1016 .
INGRAM, T.J., REID, J.B., MACMILLA, J., 1986. The quantitative relationship between gibberellin A_1 and internode growth in *Pisum sativum* L. *Planta* 168:414-420.
INSAM, H., RANGGER, A., 1997. Microbial Communities; functional versus structural approaches, Springer Verlag, Heidelberg.
JACKSON, T.A., 1996. Utilización de bacterias para el control de insectos plaga de la agricultura. *En*: Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. R.E.Leucona (ed), Buenos Aires, pp 255-260.
JACOBSON, C.B. 1993. Isolation and characterizationof ACC deaminase from *Pseudomonas putida* GR12-2, M.Sc.thesis, Dept Biol., Universityu of Waterloo, Waterloo, Ontario Canada.
JACOBSON, C.B., PASTERNAK, J.J. y GLICK, B.R. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the palnt growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol*., 40: 1019-1025.
JJEMBA, P.K., ALEXANDER, M., 1999. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biol.Biochem*., 31:623-632.

JOHNSON, J.F., ALLAN, D.L., VANCE, C.P. y WEIBLEN, G. 1996. Root carbon dioxide fixation by phosphorus deficient *Lupinus albus. Plant Physiol.* 112: 19-30.
JONES, D.L. y DARRAH, P.R. 1994. Amino acid influx at the soil-root interface of Zea mays L. and its implications in the rhizosphere. *Plant and Soil,* 163: 1-12.
JONES, D.L. y KOCHIAN, L.V., 1996. Aluminium-organic acid interactions in acid soils. *Plant and Soil* 182: 221-228.
JONES, D.L., 1997. The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition. En: *Mineral Nutrition of higher plants*. Horst Merchner, (ed), 2nd edition, Academic press Ltd., London. Pp 537-594
JONES, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere- a critical review. *Plant and Soil* 205:25-44.
JONES, D.L., EDWARDS, A.C., DONACHIE, K. DARRAH, P.R., 1994. Role of proteinaceous amino acids released inroot exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant and Soil* 158: 183-192
JUO, P. y STOTZKY, G. 1970. Electrophoretic separation of protins from roots and root exudates. *Can. J. Bot*., 48: 713-718.
KATZNELSON, H., ROUATT, J.W. y PETERSON, E.A. 1962. The rhizosphere effect of mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Can. J. Bot*. , 40: 377-382.
KIM, D.H. y MISAGHI, I.J. 1992. Siderophore production by fluorescent pseudomonads is sensitive to changes in O2 and CO2 levels. *Soil Biol. Biochem*., 24: 821-824.
KIM, D.H., MISAGHI, I.J. y PIERSON,E.A. 1996. Fluorescent pseudomonad populations in modified rhizosphere atmospheres. *Soil Biol. Biochem*. 28(4/5): 497-501.
KJELDAHL, J. 1883. A new method for the determination of nitrogen organic matter. *Z. Anal. Chem*., 22 :366.
KLOEPPER, J.W., 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. P. 255-274 *En*: Soil microbial ecology-applications i agricultural and environmental management. Metting, F.B.Jr (ed) Marcel Dekker, New York
KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R. y SCHROTH, M.N. 1988. *Pseudomonas* inculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci. Anim. Plant Sci*., 60-64.
KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R. y ZABLOTOWICZ, R.M. 1989. Free-liviing bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*., 7: 39-43.
KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N. y MILLER, T.D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathol*, 70: 1078-1082.
KLOSS, M, IWANNEK, K.H., FENDRIK, I, NIEMANN, E.G., 1984. Organic acids in the root exudates of *diplachne fusca* (L) Beauv. *Environ. Exp. Bot*. 24:179-188.
KLOTZ, M.G. y HUTCHESON, S.W. 1992. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomoonas syringae*. *Appl.Environ.Microbiol.,* 58: 2468-2473.
KLOTZ, M.G., HOFFMANN, R. y NOVACKY, A., 1989. The critical role of the hydroxyl radical in microbial infection of plants. *En*: Plant Membrane Transport: the Current Position, (J.Daingy, M.I.Michelis, E. Marre y F.Rasi-Coldogno, eds.). Elsevier, Amsterdam, 657-662 pp.
KOBAYASHI, M, GASKIN, P., SPRAY, C.R., SUZUKI, Y, PHINNEY, B.O., and MCMILLA, J., 1993. Metabolism and biological activity of gibberellin A4 in vegetative shoots of *Zea mays*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 102:379-386
LANG, A., 1956. Bolting and flowering in biennial Hyoscyanmus niger, induced by gibberellic acid. Plant Physiology, 31(suppl), XXXV, 1956.
LEBUHN, M., HEILMANN, B. y HARTMANN, A. 1994. Effects of drying rewetting stress on microbial auxin production and L-tryptophan catabolism in soils. *Biol. Fertil. Soils*, 18: 302-310.
LEE, K.E. y PANKHURST, C.E. 1992. Soil organisms and sustainable productivity. *Aust.J.Soil Res*., 30: 855-892.
LEIGH, J.A. y COPLIN, D.L. 1992. Exopolysaccharides in plan-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol*. 46: 307-346.
LEMANCEAU, P. y ALABOUVETTE, C. 1993. Suppression of Fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontr. Sci. Tech*., 3: 219-234.
LEONG, J., 1986. Siderophores their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann.Rev.Phytopathol*. 24:187-209.
LIM, H.S., KIM, Y.S. y KIM, S.D. 1991. Pseudomonas stutzeri YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ.Microbiol*., 57: 510-516.
LINDBERGH, G.D. 1981. An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease*, 65: 680-683.
LINDERMAN, R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizobsphere microflora: The mycorrhizosphere effect. *Phytopatol*., 78: 366-371.
LLINARES, F. 1990. Densidad y actividad de los microorganismos del ciclo del nitrógeno bajo el dosel de *Elaeagnus angustifolia* L. Memoria de Licenciatura. Univ. Comp. Madrid. 137 pp.

LOEWUS, 1952. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. Sci.J.S. 2684, Minessota.
LOPEZ DE VICTORIA, G., LOVELL, C.R. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ.Microbiol*., 59: 2951-2955.
LOWRY, O.H., ROSEBROURG, N.J., FARRA, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* 193: 265-269.
LYNCH, J.M. 1987. Microbial interactions in the rhizosphere. AFRC Institute of Horticultural Research, Soil microorganisms, Pub.nº30. Soil Microbial Society of Japan, 42-73 pp.
LYNCH, J.M. 1990. The rhizosphere. J.M. Lynch (ed.). John Wiley and sons. Chichester. 458 pp.
LYNCH, J.M. y WHIPPS, J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129: 1-10.
MACDUFF, J.H., JARVIS, S.C. y DAVIDSON, I.A. 1996. Inhibition of N_2 fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) at low concentrations of NO_3 in flowing solution culture. *Plant and Soil*, 180: 287-295.
MARILLEY, L., VOGT, G., BLANC, M. Y ARAGNO, M. 1998. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and Soil*, 198: 219-224.
MARSCHNER, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press Ltd. London.
MARSCHNER, H., RÖMHELD, V., HORST, W.J. y MARTIN, P. 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 149: 441-456.
MARSCHNER, P. CROWLEY, D.E. Y HIGASHI, R.M. 1997. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*, 189: 11-20.
MARTIN, J. K. 1977 . Effect of soil moisture on the release of organic carbon from wheat roots. *Soil Biol. Biochem*., 9: 303-304.
MATAR, A.E., PAUL, J.L., JENNY, H., 1967. Two phase experiments with plants growing in phosphate-treated soil. *Soil Sci.Soc.Am.Proc*. 31:235-237
MEHARG, A.A. y KILLHAM, K. 1991. A novel method of quantifying root exudation in the presence of soil microflora. *Plant and Soil* 133: 111-116.
MOORE PH, PHARIS RP, KOSHIOKA M (1986) Gibberellins in apical shoot meristem of flowering and vegetative sugarcane. *J Plant Growth Regul* 5: 101-109
MOREL, J.L., MENCH, M. y GUCKERT, A. 1986. Measurement of Pb^{2+}, Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates fron maize (Zea mays L.) roots. *Biol. Fertil. Soils* 2: 29-34.
MÜLLER, M., DEIGELE, C. y ZIEGLER, H. 1988. Hormonal interactions in the rhizosphere of maiz (*Zea mays* L.) and their effects on plant development. *Z. Pflanzernernähr. Bodenk*., 152: 247-254.
NAGARAJAH, S., POSNER, A.M. y QUIRK, J.P. 1970. Competitive adsorptions of phosphate with polygalacturonate and other organic anions on kaolinite and oxide surfaces. *Nature* (London) 228: 83-84.
NAKAS, J.P. y KLEIN, D.A. 1980. Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of a semiarid grassland. *Appl. Environ. Microbiol*., 39: 113-117.
NASEBY, D.C., LYNCH, J.M., 1997. Functional impact of genetically modified microorganisms on the soil ecosystem. *En*: Zelikoff, j.t. (ed), Ecotoxiclogy: Responses, biomarkers and risk assessment, SOS, Fair Have, N.J., pp 419-422.
NEHL, D.B., ALLEN, S.J., Y BROWN, J.F., 1997. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl.Soil Ecol*. 5:1-20
NEWMAN, E.I. 1985. The rhizosphere: carbon sources and microbial population. *En*: Ecological Interactions in Soil, Plants Microbes and Animals, (A.H. Fitter, ed). Oxford, Blackwell Scientific. 107-121 pp.
NIETO, K.F. y FRANKENBERGER, W.T. 1989. Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Soil Biol. Biochem*., 21: 967-972.
NOODEN, L.D., y LEOPONL, A.C., 1978. Photohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission. *En*: Phytohormones and Related compounds: a comprehensive treatise. Vol. 2: Phytohormones and the Development of higher plants, eds, D.S.Letham, P.B.Goodwin and T.J.V.Higgins, Elsevier, Amsterdam, pp 329-370.
NORTON, J.M. y FIRESTONE, M.K. 1991. Metabolic status of bacteria and fungi in the rhizosphere of *Ponderosa pine* seedlings. *Soil Biol. Biochem*. 22: 449-455.
NURMIAHO-LASSILA, E.L., TIMONEN, S., HAATHELA, K Y SEN, R., 1997. Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. *Can J.Microbiol*., 43:1017-1035.
O'NEILL, G.A.,CHANWAY, C.P., AXELROOD, P.E., RADLEY, R.A., HOLL, F.B., 1992. An assessment of spruce growht response specificity after inoculation with coexistent rhixosphere bacteria. Can.J.Bot. 70:2347-2353.

O'SULLIVAN, D.J. y O'GARA, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev*., 56: 662-676.
OIKEH, S.O., CHUDE, V.O., CARSKY, R.J., WEBERS, G.K. y HORST, W.J. 1998. Legume rotation in
OKON, Y. e ITZIGSOHN, R. 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotech. Adv*., 13(3): 415-424.
OKON,Y. y LABANDERA-GONZALEZ, C.A. 1994. Agronomic applications of Azospirillum. *En*: Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, (M.H.Ryder, P.M.Stephens y G.D. Bowen, eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Adelaide, Australia. 274-278 pp.
OLSSON P.A., BAATH, E., JACOBSEN, I, SÓDERSTRÓM, B., 1996. Soil bacterial respond to presence of roots but not to mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 28(4-5):463-470.
OSWALD, E.T. y FERCHAU, H.A. 1968. Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plant and Soil,* 28: 187-192.
OTANI, T., AE, N. y TANAKA, H. 1996. Phosphorus (P)uptake mechanisms of crops grown in soils with low P status. *Soil Sci. Plant Nutr*., 42(3): 553-560.
PAUL, A. y CLARK, F.E. 1989. Occurrences and distribution of soil organics. En: Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego. 81-84 pp.
PAYANE, P.I., CORNFIELD, K.G., HOLT, L.M. y BLACKMAN, J.A. 1981. High molecular-weight subunits of glutenin and bread making quality in pathogeny of six crosses of bread weat. *J. Sci. Food Agric.* 32: 51-60.
PETTERSEN, S.O., KLUG, J.J., 1994. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and environ. Microbiol* 60:2421-2430.
PHARIS, R.P., y KING, R.W., 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. Ann.Rev.Plant Phisiol. 36:517-568.
PHINNEY, B.O., 1985. Gibberellin A_1, dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biol.Plant*. 27:172-179.
PIAO, C.G., TANG, W.J. y CHEN, Y.X.1992. Study on the biological activity of yield-increasing bacteria. *Chin.J.Microecol*., 4: 55-62.
POCHON, J y TARDIEUX, P, 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Ed de la Tourelle. St Mandé.
POOLE, 1998. Solute transport. *En* : Plant physiology, Taiz, L y Zeiger, E., 2nd Ed. Sinauer Associates Inc. 1998.
POZUELO GONZALEZ, J.M., GUTIERREZ MAÑERO, F.J., PROBANZA, A. y ACERO, N. 1995. Effects of Alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) roots on distribución of proteolytic, ammonifying, and nitrifying bacteria in soil. *Geomicrobiol. J.,* 13: 129-138.
PRIHA, O y SMOLANDER, A. 1997. Microbial biomass and activity in soil and litter under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at originally similar field afforestation sites. *Biol. Fertil. Soils* 24: 45-51.
PROBANZA, A, ACERO, N, RAMOS B, GUTIERREZ MAÑERO, FJ, 1997. Effects of european alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) rhizobacteria on nodular metabolism and root development. *Pl Growth Reg*, 22:145-149.
PROBANZA, A., 1994. Interacciones de *A. glutinosa* (L.) Gaertn. Con su rizosfera bajo distintas condiciones. U.C.M., Fac. CC. Biológicas pp 197.
PROBANZA, A., LUCAS, J.A., ACERO, N. y GUTIERREZ MAÑERO, F.J. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)] growth. I. charaterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*, 182*:* 59-66
PROVOROV, N.A., SAIMNAZAROV, U.B., TANRIVERDIEV, T.A. y SIMAROV, B.V. 1994. The contributios of platn and bacteria genotypes in the growth and nitrogen accumulation of inoculated alfalfa. *Plant and Soil,* 164: 213-219.
PRYCE RJ (1973) Decomposition of aqueous solutions of gibberellic acid upon autoclaving. *Phytochemistry* 12: 508-514
RADEMACHER W ,1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul* 15: 303-314
RADEMACHER, W, 1991. Biochemical effects of plant growth retardants. *En*: Gausman HW (ed) Plant biochemical regulators, Marcel Dekker Inc, new York, pp 169-200
RADEMAKER, J.L.W. y DE BRUIJN, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *En*: DNA markers: Protocols, Applications and Overviews. G. Caetano-Anolles & P.M. Gresshoff (eds.). John Willey & Sons, New York. pp 151-171.

RAMBELLI, A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae. *En*: Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology, (G.C.Marks and T.T.Kozlowski, eds.). Academic press, Nueva York, pp 299-343.
RASMUSSEN, U., JOHENSSON, C., RENGLIN, A., PETERSSON, C. y BERGMAN, B. 1996. A molecular characterization of the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: comparison with *Rhizobium*- and *Agrobacterium*-plant interactions. *New Phytol*., 133: 391-398.
RAY, T.C., CALLOW, J.A. y KENNEDY, J.F. 1988. Composition of root mucilage polysaccharides from *Lepidium sativum*. *J. Exp. Bot.* 39:1249-1261.
REDDY, M.S. y RAHE, J.E., 1989. *B.subtilis* B2 and selected onion rhizobacteria in onion seedling rhizosphere: effects on seedling growth and indigenous rhizosphere microflora. *Soil Biol. Biochem*. 21:379-383
REEVE, D.R., y CROZIER, A., 1975. Gibberllin bioassays. En: *Gibberellins and plant growth*, H.N.Krishamoorty, ed, Wiley Eastern, New Delhi, Indie pp 35-64.
REEVES, D.W. 1997. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil & Tillage Research* 43: 131-167.
REINHOLD, B., HUREK, T. y FENDRIK, I. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J.Bacteriol*., 162: 190-195.
REMACLE, J. y DE LEVAL, J. 1975. L'application des indices de richesse et d'activité pour la caracterissation mocrobiologique des sols. *Rev. Ecol. Biol. Sol*., 12: 193-199.
RENNIE, R.J., y LARSON, R.I, 1979. Nitrogen fixation associated with disomic chromosome substitution lines of spring wheat. *Can. J.Bot*. 57:2771-2775
RIVAS-MARTINEZ, S., CANTO, P., FERNANDEZ-GLEZ, F. y SÁNCHEZ.MATA, D. 1988. Ensayo prelininar para una revisión de la clase *Quercetea ilicis* en España y Portugal. Dpto. Biología Vegetal II, Fac. de Farmacia, Univ. Complutense. 1-20 pp.
ROVIRA, A.D. 1956. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant and Soil,* 7:178-194.
ROVIRA, A.D. 1969. Plant root exudates. *Bot.Rev*., 35:35-57.
ROVIRA, A.D. 1973. Zones of exudates. *Bot. Rev*., 36:45-57.
RUDANSKA, M.L., Y KELKISZEWSKA-ROKICKA, B., 1997. Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA syntesizing activity. *New Phytol*. 137:509-517.
RYAN, P.R., DELHAIZE, E. y RANDALL, P.J. 1995. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta,* 196: 103-110
SACHS, R.M., BRETZ, C.F., y LANG, A., 1959. Shoot histogenesis: the early effects of gibberellin upon elongation in two rosete plants. *Am.J.Bot*. 46:376-384.
SAHARAWAT, K. L. 1982. Nitrification in some tropical soils. *Plant and Soil,* 65: 281-286.
SAKS, Y, y VANSTADEN, J., 1992. The role of gibberellic-acid in the senescence of carnation flowers. J.*Plant Physiol*. 139:484-488.
SARATHCHANDRA, S.U., BROWN, J.A. y COX, N.R. 1996. Rhizobacteria harmful to seedling growth in white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *New Zeland J. Agr. Res.*, 39: 129-136.
SCHENK, M.K. y WEHRMANN, J. 1979. The influence of ammonia in nutrient solution on growth and metabolism of cucumber plants. *Plant and Soil* 52: 403-414.
SCHIPPERS, B, BAKKER, AW, BAKKER, PAH, 1987. Interactions of deleterious and benefitioal rhizosphere microorganisms and the effect on cropping practices. *Ann Rev. Phytopathol* 25:339-358.
SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M., WEISBEEK, P.J. Y LUGTENBERG, B., 1985. Plant growth-inhibiting and stimulating rhizosphere microorganisms. *En*: Microbial communities in soil. V.Jensen, A.Kjoller, y L.J. Sorensen (eds). Elsevier. Londres pp 35-49.
SCHIPPERS, B., BAKKER, P.A.H.M., BAKKER, A.W. y PEER, R. 1991. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing *Pseudomonas* on rhizosphere interactions. *Plant and Soil* 129: 76-83.
SCHIPPERS, B.K, SCHEFFER, R.J., LUGTENGERG, B.J.J., WEISBEEK, P.J., 1995. Biocoating of seeds with plant growth promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook in agriculture*. 24(3):179-185
SCHNIDER, U., BLUMER, C., TROXLER, J., DEFAGO, G. y HAAS, D. 1994. Overproduction of the antibiotics 2,4, diacetylphloroglucinol and pyoluteorin in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO. *En*: Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, (M.J.Ryder, P.M.Stephens y G.D.Bowen, eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 120-121 pp.
SCHROTH, M.N., LOPER, J.E. y HILDEBRAND, D.C. 1984. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. *En*: Current Perspectives in Microbial Ecology, (M. J. Klug y C. A. Reddy, eds.). *Am. Soc. Microbiol*. Washington DC. 362-369 pp.
SCHUBERT, S, SCHUBERT, E. Y MENGEL, K., 1990. Effect of low pH of the root medium on proton release, growth and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). *Plant Soil* 124:239-244.

SELVADURAI, E.L., BROWN, A.E. y HAMILTON, J.T.G. 1991. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biol. Biochem*., 23(4): 401-403.
SHISHIDO, M., LOEB, B.M., CHANWAY, C.P., 1995. External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-.promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. *Can.J.Microb*., 41(8):707-713
SIMMONS, M., VAN DER BIJ, A.J., BRAND, I., DE WEGER, L.A., WIJFFELMAN, C.A. y LUGTENBERG, B.J.J. 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact*., 9(7): 600-607.
SMIT, E., WOLTERS, A., VAN ELSAS, J.D., 1995. Genetic stability , conjugal transfer and expression of heterologous DNA inserted into different plasids and the genome of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Rev. Microbiol*. 26:169-179.
SMITH, V.R. 1980. A phenol-hypochlorite manual determination of ammonium-nitrogen in Kjeldahl digests of plant tissue. *Soil Science Plant Analysis*, 11(7): 709-722 .
SMITH, W.H. 1970. Root exudates of seedling and mature sugar maple. *Phytopathol*, 60: 701-703.
SMITH, W.H. 1976. Character and significance of forest tree root exudates. *Ecology*, 57: 324-331.
SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1979. Biometría. H. Blume (ed.). 832 pp.
SOLOUCHANA, C.B. 1962. Aminoacids in root exudates of cotton. *Plant and Soil*, 26: 312-326.
STEINBERGER, Y., ZELLES, L., YUN BAI, Q, von LÜTZOW, M.,MUNCH, J.C., 1999. Phopholipid fatty acid profiles as indicators for the microbial community structure in soils along a climatic transect in the Judean Desert. *Biol. Fertil. Soils*. 28:292-300
STROM, L., OLSSON, T. y TYLER, G. 1994. Differences between calcifuge and acidifuge plants in root exudation of low-molecular organic acids. *Plant and Soil,* 167: 239-245.
STRZELCZYK, E. y POKOJSKA-BURDZEIJ, A. 1984. Production of auxins and gibberellin-like substances by micorrhizal fungi,bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant and Soil* 81: 185-194.
SUBBA RAO, N.S., 1979. Response of crops to *Azospirillum* inoculation in India. *En*: Associative N2-fixation, vol I (eds)P.B.Vose and A.P. Rueschel, pp 137-144, CRC Press, Boca Raton , FL.
subsequent seed dormancy. Hort Scie. 3:19-20.
SUMNER, M.E. 1990. Crop responses ti *Azospirillum* inoculation. *Adv. Soil Sci.,* 12: 53-168.
SUNDIN, P., VALEUR, A., OLSSON, S. y ODHAM, G. 1990. Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol*., 73: 13-22.
SUSLOW, T.V. y SCHROTH, M.N. 1982. Role of deleterius rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopatol*., 72: 111-115
SUTHERLAND, M.W., 1991. The generation of oxygen radicals during host plant response to infection.*Mol. Physiol. Plant. Pathol*., 39: 79-93.
SVENNINGSSON, H., SUNDIN, P. y LILJERBERG, C. 1990. Lipids, carbohidrates and aminoacids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. *Plant Cell Environ*., 13: 155-162.
SWAMINATHAN, M.S., 1991. Sustainable agricultural systems and food security. *Outlook in agriculture* 20:243-249
SWINGS, J. 1995. Exploration of prokaryotic diversity employing taxonomy. En: Microbial Diversity and Ecosystem Function. D. Allsopp, R.R. Colwell y D.L. Hawksworth (eds.). CAB International, Wallingford, USA. pp 371-379.
TADANO, T. y SAKAI, H. 1991. Secretion of acid phosphatase by roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37: 129-140.
TAKAHASHI, N, YAMAGUCHI, I, YAMANE H, 1986. Gibberrellins. *En*: N Takahashi, ed, Ghemistry of Plant Hormones. CRC Press, Boca-Ratón, FL, pp 57-151
TALON, M, HEDDEN, P, PRIMO-MILLO, E (1990) Gibberellins in *Citrus sinensis*: A comparison between seeded and seedless varieties. *J Plant Growth Regul* 9: 201-206
TALON, M, ZEEVAART, JAD (1992) Stem elongation and changes in the levels of gibberellins in shoots tips induced by photoperiodic treatments in the longh day plant *Silene armeria*. *Planta* 188: 457-461
TALON, M., 1993. Giberelinas. *En*: Fisiología y Bioquímica Vegetal, J.Azcon-Bieto y M.Talon. Ed.McGraw-Hill, 1993. pp 301-318.
TAMM, C.O. 1991. Nitrogen in terrestrial ecosystems. Questions of productivity, vegetational changes, and ecosystem stability. Springer-Verlag, New York.
TANG, W.H. 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. *En*: Improving Palnt Productivity with Rhizosphere Bacteria, (M.J. Ryder, P.M.Stephens y G.D.Bowen, eds.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Adelaide, Asutralia, 267-278 pp.

THOMS, K. y SATTELMACHER, B. 1990. Influence of nitrate placement on morphology and physiology of maize (*Zea mays*) root systems. En: Plant nutrition-physiology and applications (M.L. van Beusichem, ed.). Kluwer Academic. Dordrecht, The Netherlands. pp. 29-32.
TIEDJE, J.M., SEXTONE, A.J., PARKIN, T.B., REVSBECH, N.P., 1984. Anaerobic processes in soil. *Plant Soil* 76:197-212.
TIEN, T.M., GASKINS, M.H. y HUBELL, D.H. 1979. Plant growht substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol*., 37: 1016-1024.
TIESSEN, H., STEWART, J.W.B. y HUNT, H.W. 1984. Concepts of soil organic matter transformation in relation to organo-mineral particle size fractions. *Plant and Soil*, 76: 287-295.
TINKER, P.B., JONES, M.D., DURALL, D.M., 1992. A functional comarison of ecto and endomycorrhizas. En: Mycorrhizas in Ecosystems. D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter, and I.J. Alexander (eds) pp 303-310 CAB International, Wellingford, U.K.
TORSVIK, V., GOKSOYR, J. y DAAE, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
TOYODA, H. y UTSUMI, R. 1991. Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. U.S. patent Nº 4. 988 586 pp.
TROLLDENIER, G y HECHT-BUCHHOLZ, C. 1984. Effect of aeration status of nutrient solution on microorganisms, mucilage and ultrastructure of wheat roots. *Plant and Soil* 80: 381-390.
TSAI, S.M. y PHILLIPS, D.A. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 1485-1488.
TUNLID, A., WHITE, D.C., 1991. Biochemicla analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of the microbial communities in soil. *En*: Bollag, G., Stottzky (eds). Soil Biochemistry, vol 7, pp 229-262.
TURNER, D.P. y FRANTZ, E.H. 1985. The influence of western hemlock and western redcedar on microbial numbers, nitrogen mineralization, and nitrification. *Plant and Soil*, 88: 259-267
TUZUN, S., y KLOEPPER, J.W., 1994. Induced systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria. pp 104-109. *En*: Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. M.H.Ryder, P.M.Stephens, y G.D.Bowen, eds., CSIRO, Adelaide, South Australia, Australia.
UREN, N.C. 1982. Chemical reduction at the root surface. *J. Plant Nutr*., 5: 515-520.
UREN, N.C. y REISENAUER, H.M. 1988. The role of root exudates in nutrient acquisition. *En*: Advances in Plant Nutrition. Praeger, P.B.Tinker y A.Lauchli, eds.). Nueva York. 79-114 pp.
VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.F., ROSADO, A.S., SMALLA, K., 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculats and their effects in the soil environment. *J.Microbiol. Meth*.32:133-154.
VAN ELSAS, J.D., WAALWIJK, C., 1991. Methods for the detection of specific bacteria and thir genes in soil. *Agric. Ecosyst. Environ*.., 34:97-105
VAN LOON, L.C., KABER, P.A.H., PIETERSEN, C.M.J., 1998. Systematic resistance induced by rhizospehre bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 36:453-483.
VANCURA, V., 1964. Root exudates of plants. *Plant and Soil*, 21(2): 231-248.
VAUGHAN, D., LUMSDON, D.G. y LINEHAN, D.J. 1993. Influence of dissolved organic matter on the bio-availability and toxicity of metals in soils and aquatic systems. *Chem.Ecol*., 8: 185-201.
VENTURA, W. y WANTANBE, I. 1993. Green manure production of *Azolla microphulla* and *Sesbania rostrata* and their long-term effects on the rice yields and soil fertility. *Boil. Fert. Soils*, 15: 241-248.
VOISARD, C., KEEL, C., HAAS, D. y DEFAGO, G. 1989. Cyanide production by Pseudomonas fluorescens helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J*., 8: 351-358.
VOLLBRECTH, P., KLEIN, E. y KASEMIR, H. 1989. Different effects of supplied ammonium on glutamine activity in mustard (*Sinapis alba*) and pine (*Pinus sylvestris*). *Physiol. Plant*., 77: 129-135.
VORSTER, P.W. y JOOSTE, J.H. 1986. Translocation of potassium and phosphate from ordinary and proteoid roots to shoots in the Proteaceae. *S. Afr. J. Bot.* 52: 282-285.
WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., SCHLEIFER, K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependant methods for describing microbial community structure. *Appl and Environ. Microb*. 59:1520-1525.
WALKLEY, A. y BLACK, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titulation method. *Soil. Sci*., 37: 29-38.
WALWORTH, J.L. 1992. Soil drying and rewetting, or freezing and thawing, affects soil solution composition. *Soil Sci. Soc. Am. J*., 56:433-437.
WANG, Y., BROWN, H.N., CROWLEY, K.E. y SZANISZLO, P.J. 1993. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenidcally grown cucumber. *Plant Cell Environ*., 16: 579-585.

WATT, M., McCULLY, M.E. y JEFFREE, C.E. 1993. Plant and bacterial mucilages of the maize rhizosphere-comparison of their soil binding properties and histochemistry in a model system . *Plant and Soil,* 151: 151-165.
WEATHERBURN, W. 1967. Phenol-hypoclorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem*., 39: 971-973.
WEI, A.M., SNEATH, B.J. y BEER, S.V. 1992. Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol*., 174: 1875-1882.
WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pahtogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann.Rev.Phytopatol*., 26: 379-407.
WESTWOOD, M.N., y BJORNSTAD, H.O., 1968. Effects of gibberellin A3 on fruti shape and
WHEATLEY, R., RITZ, K. y GRIFFITHS, B. 1990. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. *Plant and Soil,* 127: 157-167.
WHIPPS, J.M. 1990. Carbon economy. *En*: The Rhizosphere, (J.M. Lynch, ed.). John Wiley. 59-97 pp.
WHIPPS, J.M. y LYNCH, J.M. 1986. The influence of the rhizosphere on crop productivity. *Adv. Microb. Ecol*. 6: 187-224.
WIEHE, W. y HÖFLICH, G. 1995. Establishment of plant growth promoting bacteria in the rhizosphere of subsequent plants after harvest of the inoculated precrops. *Microbiol.Res.,* 150: 331-336.
WILKINSON, S.G., 1988. Gram-negative bacterial. *En*: Microbial lipids Vol. 1. Eds, C. Ratledge and S.G. Wilkinson pp. 299-488. Academic Press, London
WILLIAMS, P.M. y SICARDI DE MALLORCA, M. 1982. Abscisic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of *Glycine max*. *Plant and Soil* 65: 19-26.
WINDING, A., 1994. Fingerprinting bacterial soil communities usign BIOLOG microtitre paltes. *En*: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (eds), Beyond the Biomass: compositional and functional analysis of soil microbial communities, John Wiley, Chichester, pp 85-94.
WOLTZ, S.S. 1978. Non-parasitic plant pathogens. *Annu. Rev.Phytopatol*. 16: 403-430.
WOOD, R.D., KELLER, C.K. y JOHNSTONE, D.L. 1993. In situ measurement of microbial activity and controls on microbial CO_2 production in the unsaturated zone. *Water Resourc.Res*., 29: 647-659.
XU , Y:L, GAGE, DA and ZEEVAART, J.A.D.,1997. Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 114:1471-1476
YAMAGUCHI, M., FLOCKER, W.J. y HOWARD, F.D. 1967. Soil atmosphere as influenced by temperature and moisture. *Soil Sci. Soc. Am. Proc*., 31: 164-167.
YOSHIKAWA, M, HIRAI, N, WAKABAYASHI, K, SUGIZAKI, H, IWAMURA, H., 1993. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*. *Can. J.Microbiol*. 39:1150-1154.
ZHANG, F., RÖMHELD, V., MARSCHNER, H., 1991. Release of zinc mobilizing root exudates in different plant species as affected by zinc nutritional status. *J.Plant Nutr*. 14:675-686
ZEHNDER, G., KLOEPPER, J., TUZUN, S., YAO, C., WEI, G., CHAMBLISS, O. y SHELBY, R. 1997. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria-induced plant resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 81-85.
ZEHNDER, G., KLOEPPER, J., YAO, C. y WEI, G. 1997a. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (coleoptera: Chrysomelidae) by plant groth-promoting rhizobacteria. *Journal of Economic Entomology* Vol. 90 Nº 2: 391-396.
ZHANG, F.S., MA, J. y CAO, Y.P. 1997a. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish *(Raghanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant and Soil* 196: 261-264.
ZHOINSKA, E., LEJCZAK, B. y KAFARSI, P. 1992. Organophosphate utilization by wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol*., 58: 2993-2999.
ZWART, K.B.,KUIKMAN, P.J., VAN VEEN, J.A., 1994. Rhizosphere protozoa: their significance in nutrient dynamics. *En*: Darbyshire, (ed) Soil Protozoa CAB International. Wallingford, pp 93-105.

11. APÉNDICES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

APÉNDICE 1

Tablas de la I a la VIII: Resultados de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos, extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa*, inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), en condiciones de laboratorio

Tabla I. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.pumilus* (BP) y no inoculadas (control C), crecidas en el suelo A (PLFAs de suelo)

	C 0	BP 0	C1	BP1	C2	BP 2	C3	BP3
15;0	0,835	0,956	0,775	0,435	0,477	0,816	0,869	1,028
br16;0	1,133	1,182	1,027	0,430	0,909	1,077	1,104	0,963
i16:1	0	0,133	0	0	0	0	0	0
i16:0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w9	0	0,682	0	0	0	0	0	0
16:1w7c	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0,284	0,395	0,678	0,635	0,713	0,764	0,571	0,757
16:1w5	0,436	0,484	0	0	0	0	0	0
16;0	0	0,388	0	0	0	0	0	0
br17;0	0,863	0,868	0,801	0,730	0,772	0,825	0,792	0,395
Me16	0	0	0	0	0	0	0	0
i17	0,915	0,512	0	0,850	0,905	0,445	0,444	0,952
a17	0	0,546	0	0	0,328	0,290	0	0,315
17:1w8	0,527	0,650	0,508	0,491	0,552	0,570	0,279	0,573
cy17	0,522	0,670	0,516	0,460	0,554	0,561	0,256	0,565
17;0	0,247	0	0,248	0,279	0,302	0	0,296	0,259
br18;0	0,345	0,635	0,307	0,273	0,319	0,597	0	0,347
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	0	0	0	0	0	0,707	0	0
18:1w9	0,488	0,576	0,561	0,491	0,625	0,655	0,524	0,869
18:1w7	0,964	0,927	0,424	0,855	0,924	0,931	0,824	1,039
18;1	1,083	1,018	0,907	0,970	1,023	0,966	0,879	1,087
18;0	0,318	0	0	0	0	0	0	0,241
Me18	0,910	1,048	1,077	0,922	1,016	1,030	0,598	0,753
cy19	0,528	0,727	0,318	0,370	0,818	0,741	0,354	0,793

Tabla II. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de las cepas bacterianas viables y cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.pumilus* (BP) y no inoculadas (control. C), crecidas en el suelo A (PLFAs de placa)

	C 0	BP0	C1	BP1	C2	BP2	C3	BP3
15;0	2,325	2,059	1,781	1,568	2,275	2,376	1,802	2,322
br16;0	1,973	2,182	1,948	1,689	2,423	2,411	1,590	2,412
i16:0	0,408	0,998	0,771	0,204	0,533	0,594	0,733	0,631
16:1w9	0,448	0,325	0,369	0,292	0,649	0,900	0,777	0,814
16:1w7c	0,826	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0,748	0	0,511	0,945	0	1,545	1,206	0,737
16:1w5	0,521	1,484	0,656	0	1,397	0	0	0,672
16;0	1,254	0,581	1,014	0,721	1,324	1,399	0,786	1,490
br17;0	0,662	1,103	1,287	1,256	1,407	1,348	0,561	1,281
Me16	0	0	0,169	0	0	0,420	0,247	0,205
i17	0,986	0,925	0,718	0,582	0,572	1,230	1,143	0,622
a17	0,561	0	0,131	0,118	0,236	0,855	0,577	0,291
17:1w8	1,646	1,393	1,027	0,941	1,315	1,510	1,345	1,365
cy17	1,825	1,474	0,968	0,797	1,363	1,445	1,003	1,362
17;0	0,495	0,705	0	0	0	0	0	0
br18;0	0,252	1,967	0	0	0	0,218	0	0
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	0,310	0	0	0	0	0	0	0
18:1w9	0	0	0	0	0	0	2,003	0
18:1w7	0,631	0,526	0,782	0,339	0,688	0,716	0,563	0,742
18;1	1,680	0	1,094	0,801	0,531	1,219	0,304	1,029
18;0	0	0	0	0,283	0	0	0	0
Me18	0	0,323	0,246	0,445	0,599	0,569	0,237	0,380
cy19	0	0	0	0	0	0	0	0

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Tabla III. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.licheniformis* (BL) y no inoculadas (control, C), crecidas en el suelo A (PLFAs de suelo)

	C 0	BL 0	C1	BL1	C2	BL 2	C3	BL3
15;0	0,835	0,440	0,775	1,037	0,477	1,133	0,869	1,065
br16;0	1,133	0,998	1,027	0,985	0,909	1,094	1,104	1,024
i16:1	0	0	0	0	0	0	0	0
i16:0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w9	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7c	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0,284	0,677	0,678	0,734	0,713	0,765	0,571	0,759
16:1w5	0,436	0	0	0,415	0	0	0	0
16;0	0	0	0	0	0	0	0	0
br17;0	0,863	0,783	0,801	0,421	0,772	0,887	0,792	0,872
Me16	0	0	0	0	0	0	0	0
i17	0,915	0,389	0	0,931	0,905	0,941	0,444	0,947
a17	0	0	0	0	0,328	0,309	0	0,381
17:1w8	0,527	0,514	0,508	0,544	0,552	0,578	0,279	0,555
cy17	0,522	0,505	0,516	0,514	0,554	0,611	0,256	0,542
17;0	0,247	0,603	0,248	0	0,302	0	0,296	0,309
br18;0	0,345	0,164	0,307	0,578	0,319	0,572	0	0,242
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	0	0	0	0,351	0	0,393	0	0
18:1w9	0,488	0,445	0,561	0,695	0,625	0,477	0,524	0,889
18:1w7	0,964	0,908	0,424	0,912	0,924	0,898	0,824	0,948
18;1	1,083	1,048	0,907	1,005	1,023	0,956	0,879	1,077
18;0	0,318	0,271	0	0	0	0	0	0
Me18	0,910	1,002	1,077	1,046	1,016	0,967	0,598	0,727
cy19	0,528	0,784	0,318	0,809	0,818	0,749	0,354	0,783

BIBLIOTECA VIRTUAL

Tabla IV. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de las cepas bacterianas viables y cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B, licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A (PLFAs de placa)

	C 0	BL 0	C1	BL1	C2	BL2	C3	BL3
15;0	2,325	2,520	1,781	2,418	2,275	1,859	1,802	2,222
br16;0	1,973	2,530	1,948	2,182	2,423	1,831	1,590	2,153
i16:0	0,408	0,963	0,771	1,454	0,533	0,773	0,733	1,146
16:1w9	0,448	0,675	0,369	1,411	0,649	0,505	0,777	0,977
16:1w7c	0,826	0,705	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0,748	0,717	0,511	0,722	0	1,170	1,206	1,637
16:1w5	0,521	0	0,656	1,964	1,397	0	0	0
16;0	1,254	1,478	1,014	0,629	1,324	0,771	0,786	1,098
br17;0	0,662	0,887	1,287	1,306	1,407	0,909	0,561	0,911
Me16	0	0,811	0,169	0,971	0	0	0,247	0,592
i17	0,986	0,300	0,718	1,728	0,572	0,467	1,143	1,382
a17	0,561	1,373	0,131	1,360	0,236	0,132	0,577	0,714
17:1w8	1,646	1,605	1,027	1,996	1,315	1,255	1,345	1,753
cy17	1,825	0	0,968	1,530	1,363	0,962	1,003	1,374
17;0	0,495	0	0	0,390	0	0	0	0
br18;0	0,252	0	0	0	0	0,605	0	0
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0,271
182w;6	0,310	0	0	0	0	0	0	0,357
18:1w9	0	0	0	0,578	0	0,358	2,003	0
18:1w7	0,631	0,733	0,782	0,573	0,688	0,281	0,563	0,535
18;1	1,680	0	1,094	1,126	0,531	0,431	0,304	0,699
18;0	0	0,399	0	0	0	0	0	0
Me18	0	0	0,246	0,728	0,599	0,532	0,237	0,263
cy19	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla V. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.pumilus* (BP) y no inoculadas (control, C), crecidas en el suelo B (PLFAs de suelo)

	C 0	BP0	C1	BP1	C2	BP2	C3	BP3
15;0	0,818	0,683	0,447	0,461	0,396	0,189	0,725	0,408
br16;0	0,832	1,037	0,703	0,995	1,053	0	1,093	0,345
i16:0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w9	0,513	0,681	0	0	0,310	0	0	0
16:1w7c	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0,287	0,348	0	0	0	0	0,378	0
16:1w5	0	0	0	0	0	0	0	0
16;0	0	0,276	0	0	0	0	0	0
br17;0	0,618	0,357	0	0	0	0	0,450	0,399
Me16	0	0	0	0	0	0	0	0,500
i17	0	0,561	0,242	0	0	0	0,643	0
a17	0,487	0,539	0	0	0,317	0	0,348	0
17:1w8	0,208	0,209	0	0	0	0	0	0,185
cy17	0,314	0,330	0	0	0	0	0,301	0,312
17;0	0	0	0	0	0	0	0	0
br18;0	0	0	0	0	0	0	0,299	0,197
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	0	0	0	0	0,730	0,366	0	0
18:1w9	0,621	0,269	0,443	0	0,540	0,323	0,434	0
18:1w7	0,608	0,230	0,607	0,453	0,591	0,322	0,660	0
18;1	0,600	0,534	0,480	0,462	0,543	0,275	0,610	0,337
18;0	0	0	0	0	0	0	0	0,333
19:1a		0,907	0,625	0,489	0,765	0	0,749	0,307
Me18	0,837	0,840	0,954	0,812	0,859	0,401	0,353	0
19:1b	0	0	0	0	0	0	0,247	0,356
cy19	0	0	0	0	0	0	0,342	0
20:4	0,677	0,767	0	0	0,449	0	0,236	0
20:5	0	0	0	0	0	0	0	0
20:0	0	0	0	0	0	0	0	0

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Tabla VI. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de las cepas bacterianas viables y cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.pumilus* (BP) y no inoculadas (control, C), crecidas en el suelo B (PLFAs de placa)

	C 0	BP0	C1	BP1	C2	BP2	C3	BP3
15;0	2,088	2,373	1,792	1,281	2,262	2,250	2,322	2,353
br16;0	2,370	1,734	1,976	1,627	2,384	2,424	2,351	2,167
i16:0	0,389	0,953	0,741	0	1,179	1,178	0	1,371
16:1w9	0	0,832	0,503	0	0,776	0,481	1,048	1,221
16:1w7c	0	1,141	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0	0	1,113	0,302	1,452	1,353	1,633	1,502
16:1w5	1,733	0,934	0	0,277	0	0	0	1,043
16;0	0,362	0,993	0,977	0,616	1,376	1,449	1,482	1,319
br17;0	1,891	0,380	1,587	1,060	1,102	1,259	0	0
Me16	0,297	0,343	0,260	0	0,209	0	0,606	0,852
i17	0,778	1,294	0,793	0	0,966	0,948	1,388	1,555
a17	0,486	0,627	0,270	0	0,320	0	0,699	0,909
17:1w8	1,643	1,587	0,985	0,225	1,290	1,152	1,648	0,650
cy17	1,902	1,586	0,960	0,705	1,432	1,424	1,549	1,490
17;0	0,698	0,473	0	0	0	0	0,352	0,629
br18;0	1,389	0	0	0	0	0	0	0
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	0,416	0	0	0	0	0	0	0
18:1w9	0,846	0	0	0	0,239	0	0,256	0,327
18:1w7	0,717	0,395	0	0,755	0,710	0,577	0	0
18;1	1,114	0,482	0,570	0,411	0,991	1,071	0,647	0,634
18;0	0	0	0	0	0	0	0,897	1,092
19:1a	0,636	0,375	0,606	0,231	0,549	0,571	0	0
Me18	0	0	0,681	0,265	0,194	0,390	0,909	0,773
19:1b	0	0	0	0	0	0	0,497	0,511
cy19	0	0	0	0	0	0	0	0
20:4	0	0	0	0	0	0	0	0
20:5	0	0,241	0	0	0	0	0	0
20:0	0	0	0	0	0	0	0	0

BIBLIOTECA VIRTUAL

Tabla VII. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.licheniformis* (BL) y no inoculadas (control, C), crecidas en el suelo B (PLFAs de suelo)

	C0	BL0	C1	BL1	C2	BL2	C3	BL3
15;0	0,178	0,169	0,187	0,178	0	0,366	0,187	0,178
br16;0	0,138	0	0,175	0,138	00	0,313	0,175	0,138
i16:0	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w9	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7c	0	0	0,193	0	0	0,193	0,193	0
16:1w7t	0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w5	0	0	0	0	0	0	0	0
16;0	0	0	0	0	0	0	0	0
br17;0	0	0	0,588	0	0,248	0,339	0,588	0
Me16	0	0	0	0	0	0	0	0
i17	0	0,513	0	0	0	0	0	0
a17	0	0	0	0	0	0	0	0
17:1w8	0	0	0	0	0	0	0	0
cy17	0	0	0	0	0	0	0	0
17;0	0	0	0	0	0	0	0	0
br18;0	0	0	0	0	0	0	0	0
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	1,153	0,642	1,115	1,153	1,005	1,269	1,115	1,153
18:1w9	0	0	0	0	0	0	0	0
18:1w7	0,119	0,687	0,428	0,119	0,420	0,237	0,428	0,119
18;1	0,580	0,604	0,569	0,580	0,543	0,712	0,569	0,580
18;0	0,346	0	0	0,346	0	0,346	0	0,346
19:1a	0,748	0,751	0,636	0,748	0,561	0,796	0,636	0,748
Me18	0	0	0	0	0	0	0	0
19:1b	0	0	0	0	0	0	0	0
cy19	0	0	0	0	0	0	0	0
20:4	0	0	0	0	0	0	0	0
20:5	0	0	0	0	0	0	0	0
20:0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla VIII. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de las cepas bacterianas viables y cultivables, procedentes de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.licheniformis* (BL) y no inoculadas (control, C), crecidas en el suelo B (PLFAs de placa)

	C 0	BL0	C1	BL1	C2	BL2	C3	BL3
15;0	0,753	0,862	0,344	0,549	0,991	0,755	1,550	1,387
br16;0	0,549	0,701	0,936	1,219	0,804	0,597	1,287	1,235
i16:0	0,355	0	0	0,326	0	0	0,225	0,499
16:1w9	0,491	0	0,194	0,458	0	0	0,613	0,622
16:1w7c	0	0,493	0,352	0,434	0	0,397	0	0,346
16:1w7t	0	0	0	0	0	0	0,397	1,033
16:1w5	0,640	0,703	0	1,263	0,358	0,598	0,515	0
16;0	0,154	0	0,281	0,136	0	0	0,166	0,364
br17;0	0,681	0,304	0,534	0,905	0,320	0,227	0,896	0,559
Me16	0,325	0	0,100	0,297	0	0	0,170	0,311
i17	0,478	0,614	0,173	1,017	0	0,512	0,853	0,782
a17	0,251	0,257	0,271	0,442	0	0,187	0,330	0,511
17:1w8	0,544	0,669	0	1,201	0,240	0,565	1,133	0,992
cy17	0,311	0,416	0,339	0,729	0,308	0,326	0,671	0,317
17;0	0	0	0,506	0	0	0	0	0
br18;0	0,127	0	0,120	0,111	0	0	0,090	0,127
Me17	0	0	0	0	0	0	0	0
182w;6	0,948	0,131	1,119	0,278	1,240	0,088	0,069	0,125
18:1w9	0	0	0	0	0	0	0	0
18:1w7	0,419	0,180	0,410	0	0,612	0,124	0,083	0,131
18;1	0,634	0,258	0,670	0,250	1,195	0,188	0,154	0,832
18;0	0,048	0	0,879	0,041	0	0	0	0
19:1a	0,842	0,285	0,847	0,616	0,844	0,210	0,291	0,690
Me18	0	0	0	0	0	0	0	0
19:1b	0	0	0	0	0	0	0	0
cy19	0	0	0	0	0	0	0	0,493
20:4	0	0,194	0	0	0	0,135	0	0
20:5	0	0	0	0	0	0	0	0
20:0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablas de la IX a la XVI: Medidas biométricas en condiciones de laboratorio.

Tabla IX. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), en los cuatro tiempos de muestreo en el suelo A. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

SA cm^2	T0	T1	T2	T3
Control	3,61 ± *0,37*	6,61 ± *2,21*	30,69 ± *3,23*	50,67 ± *7,92*
B.pumilus	5,62 ± *0,99*	10,36 ± *2,04*	51,34 ± *0,15*	93,68 ± *0,64*
B.licheniformis	3,51 ± *0,24*	8,92 ± *0,21*	36,21 ± *4,49*	73,57 ± *0,27*

Tabla X. Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los cuatro tiempos de muestreo en el suelo A., Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LA (cm)	T0	T1	T2	T3
Control	3,54 ± *0,47*	3,86 ± *0,68*	6,19 ± *0,17*	9,16 ± *0,03*
B.pumilus	4,90 ± *0,06*	4,88 ± *0,57*	8,05 ± *0,68*	12,0 ± *0,35*
B.licheniformis	3,84 ± *0,26*	4,47 ± *0,24*	7,14 ± *0,47*	10,87 ± *0,14*

Tabla XI. Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los cuatro tiempos de muestreo, en el suelo A. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

SR (cm^2)	T0	T1	T2	T3
Control	4,32 ± *0,09*	11,68 ± *5,30*	27,88 ± *5,59*	47,46 ± *5,16*
B.pumilus	3,48 ± *0,70*	10,64 ± *2,05*	20,60 ± *2,76*	44,60 ± *5,27*
B.licheniformis	4,54 ± *0,50*	6,13 ± *0,02*	13,20 ± *1,40*	38,81 ± *1,09*

Tabla XII. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los cuatro tiempos de muestreo, en el suelo A. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LR	T0	T1	T2	T3
Control	19,91 ± *1,05*	45,27 ± *19,63*	104,44 ± *11,61*	151,79 ± *15,56*
B.pumilus	10,49 ± *2,01*	49,22 ± *5,36*	87,75 ± *17,43*	166,60 ± *34,91*
B.licheniformis	24,72 ± *5,09*	36,94 ± *11,72*	53,39 ± *11,93*	142,80 ± *21,65*

Tabla XIII. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo en suelo B. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

SA cm^2	T0	T1	T2	T3
Control	4,94 ± *0,57*	6,21 ± *0,96*	37,28 ± *7,45*	41,37 ± *1,47*
B.pumilus	3,40 ± *0,24*	3,68 ± *0,24*	54,56 ± *3,89*	50,05 ± *3,02*

	T0	T1	T2	T3
Control	5,67 ± *0,02*	12,15 ± *1,09*	52,45 ± *9,15*	49,23 ± *2,12*
B.licheniformis	5,85 ± *0,47*	10,61 ± *1,76*	51,10 ± *0,84*	49,99 ± *0,13*

Tabla XIV. Resultados de longitud aerea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* y *B.licheniformis* y sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo en suelo de parcela. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LA cm	T0	T1	T2	T3
Control	3,45 ± *0,29*	4,12 ± *0,52*	7,70 ± *0,45*	8,60 ± *0,57*
B.pumilus	2,99 ± *0,45*	3,08± *0,17*	9,58 ± *0,35*	9,93 ± *0,19*

	T0	T1	T2	T3
Control	3,95 ± *0,60*	5,06 ± *0,30*	9,58 ± *1,34*	8,76 ± *0,06*
B.licheniformis	4,26 ± *0,02*	4,34 ± *0,18*	8,61 ± *0,33*	11,33 ± *0,13*

Tabla XV. Resultados de superfice radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo en el suelo B. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

SR cm^2	T0	T1	T2	T3
Control	2,79 ± *0,18*	2,72 ± *0,44*	8,51 ± *2,50*	24,95 ± *1,80*
B.pumilus	2,35 ± *0,19*	6,16 ± *0,76*	21,74 ± *0,10*	35,40 ± *2,69*

	T0	T1	T2	T3
Control	4,70 ± *0,40*	4,44 ± *1,23*	14,87 ± *3,41*	21,24 ± *0,36*
B.licheniformis	5,55 ± *0,40*	5,50 ± *0,51*	20,10 ± *2,09*	40,62 ± *0,34*

Tabla XVI. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles en los cuatro tiempos de muestreo en el suelo B. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LR cm	T0	T1	T2	T3
Control	6,05 ± *0,90*	7,99 ± *0,50*	43,00 ± *5,80*	140,37 ± *6,40*
B.pumilus	6,18 ± *0,55*	24,04 ± *9,80*	97,24 ± *6,50*	150,51± *18,34*

	T0	T1	T2	T3
Control	30,19 ± *1,60*	15,02 ± *1,53*	54,81 ± *5,55*	94,34 ± *5,01*
B.licheniformis	22,44 ± *8,20*	18,96 ± *2,58*	75,87 ± *17,06*	161,8 ± *7,73*

Tablas de la XVII a la XXI: Ácidos grasos procedentes de fosfolípidos, extraídos de la rizosfera de *A.glutinosa y P,pinea*, crecidas en turba-arena, inoculados con *B.pumilus* o *B.licheniformis*, y no inoculadas (control), en condiciones de invernadero

Tabla XVII., Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.pumilus* y no inoculadas (control). (PLFAs de suelo)

	C0	C1	C2	BP0	BP1a	BP1d	BP2
i15	0	0	1,994	0	0	0	2,047
a15	0,573	0	0	0,555	0	0	0
15;0	0,609	1,403	1,070	0,676	0	0	0
br16;0	0	1,344	0,947	0	0	0,993	0
i16:1	0	0	0,644	0	0	0	0,706
i16:0	0	0	0,944	0	0	0	0,892
16:1w7c	0,944	0	0	0,913	0	0	0
16:1w5	0	0,935	0	0	0	0,926	0
16;0	0,626	0	0	0	0	0	0
br17;0	0	1,205	0	0	1,646	0,935	0
Me16	0	0	0,496	0	0	0	0,366
i17	0,715	0	0	1,003	0	1,246	0
a17	0,794	0	0	0,778	0	0	0
17:1w8	0	0	0,975	0	0	0	0
cy17	0	0	0	0	0	0	0
17;0	0	0,967	0	0	0	0	0
br18;0	0	0,974	0,585	0	0	0,615	0
Me17	0	0	0	0	0	0	0,377
182w;6	0	0	1,145	0	1,585	0	0
18:1w9	0,950	1,159	0	1,027	0	1,694	0
18:1w7	0,910	0,929	0,861	0	0	1,420	0,288
18;1	0,620	0	1,116	0,995	1,558	1,055	0
18;0	0	0	0	0	0	0	0
19:1a	1,175	1,255	1,694	1,107	1,314	0,913	0
Me18	0,844	0	0,785	1,026	0	0	0
cy19	0	0	0	0	0	0,705	0
20:4	1,199	1,407	0	1,119	1,503	1,674	0
20:0	1,352	0		1,780	0	1,304	0

Tabla XVIII. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de las cepas bacterianas viables y cultivables en placa, extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.pumilus* y no inoculadas (controles). (PLFAs de placa)

	C0	C1	C2	BP0	BP1a	BP1d	BP2
i15	0	0	0	0	0	0	0
15;0	1,276	1,291	1,387	0,840	1,05	1,256	1,095
br16;0	0,993	1,835	1,250	0,908	1,326	1,367	1,284
i16:1	0	0,374	0	0	0,452	0,403	0
i16:0	0	0	0	0	0	0	0
16:1w9	0	0	0,515	0,438	0,352	0,351	0
16:1w7c	0	0	0	0	0	0	0
16:1w7t	0,711	0,794	0,895	0,566	0,781	0	0,693
16:1w5	0	0	0	0	0,772	0	0
16;0	0	0,428	0,466	0	0,294	0	0,480
br17;0	1,636	1,378	1,520	1,297	0	0,935	1,682
Me16	0	0	0	0,310	0	0	0
i17	0,840	0,381	0,647	0,383	0,159	0	0,571
a17	0	0	0,375	0,280	0	0	0,341
17:1w8	0,350	0,404	0,729	0,283	0,302	0	0,940
cy17	0	0,833	0,599	0,531	0,812	0,700	0,460
17;0	0	1,156	0	0	1,006	1,151	0
br18;0	1,229	0,507	0	1,183	0,492	0	0
182w;6	0,293	0	0	0	0,645	0	0
18:1w9	0	0	0	0	0,399	0,430	0
18:1w7	0	0,328	0,262	0	0,570	0	0,315
18;1	0,415	0	0	1,596	1,703	1,676	1,320
19:1a	0,650	0,64	0,342	0,480	0,456	0,802	0
Me18	0	0,292	0,244	0	0	0	1,475
cy19	1,284	1,052	0	1,241	0,282	0	0

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Tabla XIX. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B.licheniformis* y no inoculadas (control). (PLFAs de suelo)

	C0	C1	C2	BL0	BL1a	BL1d	BL2
i15	0	0	1,994	0	0	0	0
a15	0,573	0	0	0,496	0	0	0
15;0	0,609	1,403	1,070	0,568	1,284	0	0
br16;0	0	1,344	0,947	0,881	1,256	1,134	1,208
i16:1	0	0	0,644	0	0	0	0
i16:0	0	0	0,944	0	0	0	1,619
16:1w7c	0,944	0	0	1,106	0	0	0
16:1w5	0	0,935	0	0	0	0,791	0
16;0	0,626	0	0	0,592	0	0	0
br17;0	0	1,205	0	0	0	0	0
Me16	0	0	0,496	0	0	0	0,796
i17	0,715	0	0	0,809	0	0	0
a17	0,794	0	0	0,778	0	0	0
17:1w8	0	0	0,975	0	0	1,268	0
cy17	0	0	0	0,430	0	0,664	0
17;0	0	0,967	0	0	0	1,911	0
br18;0	0	0,974	0,585	0,639	0	0	1,588
Me17	0	0	0	0	0	0,803	0
182w;6	0	0	1,145	1,714	1,651	1,301	0
18:1w9	0,950	1,159	0	0,698	0	1,543	0
18:1w7	0,910	0,929	0,861	0,640	1,015	0,756	0
18;1	0,620	0	1,116	0,618	1,152	0,970	0,759
18;0	0	0	0	0	0	1,704	0
19:1a	1,175	1,255	1,694	1,070	1,025	0	0
Me18	0,844	0	0,785	0,599	0	0	0
cy19	0	0	0	0	1,153	0	0
20:4	1,199	1,407	0	0,920	1,766	0	0
20:0	1,352	0		1,418	0	0	0

Tabla XX. Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de las cepas bacterianas viables y cultivables, extraidas de la rizosfera de plántulas de *A.glutinosa* inoculadas con *B, ,licheniformis* y no inoculadas (control). (PLFAs de placa)

	C0	C1	C2	BL0	BL1a	BL1d	BL2
i15	0	0	0	0	0,129	0	0,517
15;0	1,276	1,291	1,387	1,278	1,217	0	1,254
br16;0	0,993	1,835	1,250	1,391	1,520	1,454	1,367
i16:1	0	0,374	0	0	0	0,328	0
i16:0	0	0	0	0,235	0,210	0	0
16:1w9	0	0	0,515	0	0,285	0,355	0,659
16:1w7c	0	0	0	0	0	0	0,264
16:1w7t	0,711	0,794	0,895	0,656	0,511	0,224	0,761
16:1w5	0	0	0	0	0	0	0
16;0	0	0,428	0,466	0,214	0,344	0,845	0,749
br17;0	1,636	1,378	1,520	1,386	1,401	0	0,744
Me16	0	0	0	0,339	0	0	0,386
i17	0,840	0,381	0,647	0,512	0,323	0	0,811
a17	0	0	0,375	0,378	0	0,434	0,675
17:1w8	0,350	0,404	0,729	0,645	0,302	0,495	0
cy17	0	0,833	0,599	0,750	0,955	0,638	1,192
17;0	0	1,156	0	0,706	0,755	1,217	0,888
br18;0	1,229	0,507	0	0,953	0	0,163	0
182w;6	0,293	0	0	0,430	0	0	0,280
18:1w9	0	0	0	0	0	0	0,121
18:1w7	0	0,328	0,262	0,335	0,184	0,422	0,336
18;1	0,415	0	0	1,620	0	1,684	0,863
19:1a	0,650	0,64	0,342	0,528	0,318	0	0,336
Me18	0	0,292	0,244	0,566	0	0	0,231
cy19	1,284	1,052	0	0,838	0,705	0	0,097

Tabla XXI: Porcentaje de ácidos grasos procedentes de fosfolípidos extraídos de la rizosfera de plántulas de *P,pinea,* inoculadas con *B.pumilus, B.licheniformis* y no inoculadas (control). (PLFAs de placa)

	C1	C2	BP1	BP2	BL1	BL2
14:0	0,181	0,799	0,432	0,545	0,981	0,733
a15	0	0	0	0	1,963	0
15;0	0,547	1,817	0,959	1,641	2,226	1,694
br16;0	0	1,415	1,174	1,403	0	1,858
i16:1	0	0	0,243	0,459	0,383	0,506
i16:0	0	0,651	0	0,407	0	0,172
16:1w7c	0	1,248	0	1,157	1,355	1,047
16:1w7t	0,349	0	0,690	0	0	0
16:1w5	0	0,618	0	0,365	0,44	0,322
16;0	0,143	1,652	0,209	1,637	0	1,828
br17;0	0,719	0	1,361	0,198	0,319	0
Me16	0	0,493	0	0,535	0,926	0,408
i17	0,269	0,153	0,275	0,399	1,663	0,249
a17	0	0,798	0	1,077	0	0,813
17:1w8	0	1,573	0,293	1,293	1,133	1,469
cy17	0,714	0	0,842	0,235	0	0
17;0	0,593	0	0,423	0,154	0	0,349
br18;0	0	0,659	0,490	0,577	0	0,454
182w;6	0,382	0,755	0,473	0,263	0	0,593
18:1w9	0	0,486	0	0,350	0	0,423
18:1w7	0,664	0	0,166	0	0,487	1,909
18;1	0,810	0,709	0,153	0,740	1,627	0,631
18:0	0,382	0,659	0,530	0,691	0,682	0,523
19:1a	0	0	0	0,122	0	0,426
Me18	0	0,098	0	0,665	0	0
cy19	0,631	0,549	0,709	0	0,943	0

Tablas de la XXII a la XXIX: Resultados de los análisis biométricos de plántulas de *A.glutinosa* y *P,pinea*, inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en condiciones de invernadero,

Alnus glutinosa

Tabla XXII. Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LA (cm)	T0	T1	T2
Control	6,65 ± *0,38*	7,98 ± *0,60*	8,98 ± *0,89*
B.pumilus	5,62 ± *0,60*	7,83 ± *0,39*	8,48 ± *0,99*
B.licheniformis	5,05 ± *0,41*	8,74 ± *0,87*	10,04 ± *0,82*

Tabla XXIII. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

SA (cm^2)	T0	T1	T2
Control	17,02 ± *2,16*	21,10 ± *2,19*	34,31 ± *3,52*
B.pumilus	11,31 ± *0,84*	17,23 ± *1,11*	40,28 ± *0,63*
B.licheniformis	7,87 ± *0,48*	23,57 ± *2,45*	47,31 ± *2,80*

Tabla XXIV. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva,

LR (cm)		T1	T2
Control	67,56 ± *20,67*	186,17± *10,89*	239,57 ± *30,46*
B.pumilus	41,03 ± *8,94*	170,50 ± *13,3*	239,14 ± *4,58*
B.licheniformis	37,97 ± *14,65*	170,64 ± *22,5*	223,95 ± *6,80*

Tabla XXV: Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva,

SR (cm^2)	T0	T1	T2
Control	12,2 ± *5,04*	33,45 ± *7,12*	35,24 ± *6,39*
B.pumilus	8,18 ± *2,99*	38,55 ± *7,37*	37,03 ± *6,67*
B.licheniformis	5,98 ± *3,05*	41,93 ± *7,59*	46,53 ± *6,01*

Pinus pinea

Tabla XXVI. Resultados de longitud aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LA (cm)	T0	T1	T2
Control	4,63 ± *0,63*	8,42 ± *1,83*	11,59 ± *0,30*
B.pumilus	6,25 ± *1,15*	13,29 ± *1,81*	11,65 ± *0,57*
B.licheniformis	4,87 ± *0,47*	13,02 ± *1,62*	15,10 ± *2,42*

Tabla XXVII. Resultados de superficie aérea de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva

SA (cm^2)	T0	T1	T2
Control	5,62 ± *1,06*	14,90 ± *3,73*	22,96 ± *1,01*
B.pumilus	7,78 ± *1,16*	24,46 ± *3,71*	21,73 ± *1,75*
B.licheniformis	7,00 ± *1,37*	21,99 ± *3,23*	29,09 ± *5,08*

Tabla XXVIII. Resultados de longitud radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

LR (cm)	T0	T1	T2
Control	16,77 ± *1,09*	104,46 ± *39,6*	217,83 ± *17,23*
B.pumilus	19,40 ± *4,17*	148,29± *66,17*	166,8 ± *5,19*
B.licheniformis	19,07 ± *5,29*	153,39 ± *52,64*	190,91 ± *4,07*

Tabla XXIX. Resultados de superficie radical de las plantas inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control) en los tres tiempos de muestreo. Los resultados son las media de tres réplicas. El error estandar aparece en cursiva.

SR (cm^2)	T0	T1	T2
Control	4,10 ± *0,36*	45,05 ± *18,65*	62,27 ± *15,10*
B.pumilus	3,93 ± *0,63*	58,55 ± *38,39*	64,49 ± *7,72*
B.licheniformis	4,87 ± *1,83*	52,20 ± *14,85*	89,25 ± *10,38*

APÉNDICE 2

Tablas de la I a la XII. Caracterización fisicoquímica de la rizosfera de plántulas de aliso crecidas en los suelos A y B. inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados (control).

Tabla I. Resultados de pH en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

	T0	T1	T2	T3
Control	5,98±*0,00*	5,50±*0,01*	5,21±*0,05*	5,70±*0,11*
B.pumilus	6,04±*0,01*	5,66±*0,01*	5,25±*0,07*	5,74±*0,04*
B.licheniformis	5,57±*0,05*	5,44±*0,00*	5,46±*0,02*	5,56±*0,03*

Tabla II. Valores de nitrógeno-amonio en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

µg/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	0,82±*0,02*	0,75±*0,04*	0,85±*0,00*	0,58±*0,05*
B.pumilus	0,68±*0,02*	0,60±*0,00*	0,90±*0,04*	0,48±*0,00*
B.licheniformis	0,74±*0,08*	0,57±*0,05*	0,75±*0,08*	0,14±*0,22*

Tabla III. Valores de nitrógeno-nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

µg/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	7,64 ± *1,48*	9,59 ± *1,00*	12,98 ± *0,44*	6,73 ± *1,55*
B.pumilus	5,11 ± *0,01*	7,21 ± *0,47*	10,80 ± *0,24*	6,80 ± *0,36*
B.licheniformis	8,05 ± *2,16*	9,48 ± *1,73*	8,00 ± *1,45*	4,32 ± *0,30*

Tabla IV. Valores de nitrógeno total ($N\text{-}NH_4^+$) obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

µg N/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	3,92 ±*0,52*	4,35 ±*0,61*	3,96 ±*0,71*	5,00 ±*0,01*
B.pumilus	4,92 ±*0,14*	3,57 ±*0,00*	5,39 ±*0,60*	5,35 ±*0,13*
B.licheniformis	4,67 ±*0,52*	5,28 ±*0,16*	4,42 ±*0,10*	5,03 ±*0,17*

Tabla V. Valores de carbono orgánico (%) obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

%	T0	T1	T2	T3
Control	7,00 ± *0,00*	7,00 ± *0,40*	6,75 ± *0,20*	8,00 ± *0,40*
B.pumilus	7,25 ± *0,20*	5,50 ± *0,80*	6,00 ± *0,00*	7,50 ± *0,40*
B.licheniformis	6,75 ± *0,20*	6,50 ± *0,00*	6,50 ± *0,00*	7,50 ± *0,40*

Tabla VI. Valores de C,I,C, obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas (control), crecidas en el suelo A. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

meq NH_4^+	T0	T1	T2	T3
Control	37,42 ± *0,76*	44,20 ± *1,89*	35,84 ± *0,90*	42,40 ± *2,25*
B.pumilus	42,42 ± *5,70*	48,72 ± *0,09*	42,62 ± *3,67*	41,74 ± *0,66*
B.licheniformis	37,82 ± *1,06*	36,52 ± *0,16*	34,70 ± *0,89*	37,36 ± *0,75*

Tabla VII. Valores de pH obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

	T0	T1	T2	T3
Control	8,26±*0,01*	7,96±*0,13*	8,18±*0,02*	8,19±*0,09*
B.pumilus	8,22±*0,06*	8,15±*0,01*	8,20±*0,07*	8,75±*0,18*

	T0	T1	T2	T3
Control	7,47±*0,11*	7,65±*0,08*	6,88±*0,10*	7,44±*0,09*
B.licheniformis	7,27±*0,02*	7,05±*0,03*	7,03±*0,15*	6,99±*0,18*

Tabla VIII. Valores de nitrógeno amonio obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

µg/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	0,11 ± *0,02*	0,26 ± *0,19*	0,14 ± *0,04*	0,46 ± *0,09*
B.pumilus	0,17 ± *0,06*	0,28 ± *0,17*	0,43 ± *0,09*	0,26 ± *0,09*

µg/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	0,11 ± *0,01*	0,15 ± *0,006*	0,31 ± *0,01*	0,22 ± *0,008*
B.licheniformis	0,15 ± *0,01*	0,18 ± *0,02*	0,37 ± *0,03*	0,25 ± *0,04*

Tabla IX. Valores de nitrógeno nitrato obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

µg/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	4,47 ± *0,51*	7,37 ± *0,51*	2,00 ± *0,28*	1,05 ± *0,20*
B.pumilus	3,35 ± *0,61*	5,17 ± *0,22*	2,42 ± *0,38*	3,95 ± *0,53*

µg/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	1,72 ± *0,22*	2,22 ± *0,46*	1,90 ± *0,00*	1,17 ± *0,06*
B.licheniformis	1,95 ± *0,24*	2,92 ± *0,75*	1,70 ± *0,12*	1,35 ± *0,00*

Tabla X. Valores de nitrógeno total (nitrógeno amonio) obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

µg NH_4^+/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	1,17 ±*0,26*	1,15 ±*0,36*	0,55 ±*0,16*	0,64 ±*0,00*
B.pumilus	1,30 ±*0,04*	0,99 ± *0,02*	1,06 ±*0,32*	0,60 ±*0,002*

µg NH_4^+/g suelo	T0	T1	T2	T3
Control	1,26 ±*0,15*	1,26 ±*0,01*	1,28 ±*0,17*	1,15 ±*0,19*
B.licheniformis	1,41 ±*0,07*	1,37 ±*0,04*	1,42 ±*0,02*	1,46 ±*0,03*

Tabla XI. Porcentaje de carbono orgánico obtenido en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

%	T0	T1	T2	T3
Control	2,75 ± *0,20*	3,25 ± *0,20*	2,25 ± *0,60*	2,75 ± *0,20*
B.pumilus	3,00 ± *0,40*	2,00 ± *0,00*	3,00 ± *0,00*	2,25 ± *0,20*

%	T0	T1	T2	T3
Control	4,50 ± *0,40*	4,00 ± *0,80*	1,00 ± *0,00*	1,50 ± *0,40*
B.licheniformis	4,00 ± *0,80*	3,00 ± *0,00*	2,00 ± *0,80*	2,00 ± *0,00*

Tabla XII. Valores de C.I.C. obtenidos en la rizosfera de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los valores corresponden a la media de tres réplicas por cada tiempo de muestreo; el error estandar aparece en cursiva.

meq NH_4^+	T0	T1	T2	T3
Control	16,23 ± *0,87*	18,00 ± *1,46*	16,78 ± *1,71*	23,00 ± *0,62*
B.pumilus	14,84 ± *0,35*	15,14 ± *0,57*	22,72 ± *5,22*	25,00 ± *1,46*

meq NH_4^+	T0	T1	T2	T3
Control	14,25 ± *0,61*	14,50 ± *1,22*	12,20 ± *0,16*	18,60 ± *0,81*
B.licheniformis	13,55 ± *0,44*	16,30 ± *0,24*	16,70 ± *0,57*	14,10 ± *0,08*

Tablas de la XIII a la XX. Caracterización de los exudados recogidos de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados, crecidas en los suelos A y B

Tabla XIII. Valores de pH en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados, crecidas en el suelo A. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

	T0	T1	T2	T3
Control	7,28 ± *0,21*	7,02 ± *0,11*	7,14 ± *0,11*	7,47 ± *0,23*
B.pumilus	7,13 ± *0,10*	6,94 ± *0,08*	6,82 ± *0,03*	6,82 ± *0,10*
B.licheniformis	7,03 ± *0,10*	6,80 ± *0,02*	6,84± *0,008*	6,20 ± *0,08*

Tabla XIV. Resultados de nitrógeno nitrato en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados (control), crecidas en el suelo A. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	3,30 ± *0,65*	1,35 ± *0,28*	1,10 ± *0,32*	1,00 ± *0,24*
B.pumilus	3,95 ± *0,44*	3,40 ± *0,08*	4,75 ± *1,10*	3,30 ± *0,32*
B.licheniformis	6,20 ± *0,97*	4,15 ± *1,20*	3,80 ± *0,65*	6,35 ± *1,59*

Tabla XV. Resultados de nitrógeno total ($N\text{-}NH_4^+$) en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados (control), crecidas en el suelo A. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	0,04 ± *0,06*	0,15 ± *0,02*	0,19 ± *0,07*	0,19 ± *0,08*
B.pumilus	0,15 ± *0,02*	0,22 ± *0,01*	0,27 ± *0,04*	0,27 ± *0,04*
B.licheniformis	0,16 ± *0,04*	0,33 ± *0,07*	0,22 ± *0,02*	0,32 ± *0,02*

Tabla XVI. Resultados de carbono orgánico en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados (control) crecidas en el suelo A. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

(%)	T0	T1	T2	T3
Control	0,35 ± *0,04*	0,00 ± *0,00*	0,10 ± *0,08*	0,15 ± *0,04*
B.pumilus	0,00 ± *0,00*	0,05 ± *0,04*	0,00 ± *0,00*	0,10 ± *0,00*
B.licheniformis	0,15 ± *0,04*	0,00 ± *0,00*	0,10 ± *0,08*	0,10 ± *0,00*

Tabla XVII. Resultados de proteínas en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados (control), crecidas en el suelo A. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	$4{,}5\times10^{-2}\pm$*0,89*	$3{,}4\times10^{-2}\pm$*0,00*	$3{,}7\times10^{-2}\pm$*0,24*	$4{,}2\times10^{-2}\pm$*0,44*
B.pumilus	$3{,}7\times10^{-2}\pm$*0,24*	$4{,}5\times10^{-2}\pm$*0,89*	$3{,}7\times10^{-2}\pm$*0,24*	$5{,}9\times10^{-2}\pm$*0,89*
B.licheniformis	$3{,}7\times10^{-2}\pm$*0,24*	$3{,}3\times10^{-2}\pm$*0,28*	$3{,}0\times10^{-2}\pm$*0,32*	$10{,}8\times10^{2}\pm$*2,4*

Tabla XVIII. Resultados de azúcares totales en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculadas, crecidas en el suelo A. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	2,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00	7,0 ± 2,44	28,0 ± 0,00
B.pumilus	7,0 ± 1,63	10,5 ± 4,49	8,5 ± 1,22	28,5 ± 0,40
B.licheniformis	3,0 ± 0,81	7,5 ± 0,40	4,5 ± 2,04	44,7 ± 3,74

Tabla XIX. Contenido en lípidos de los exudados extraídos de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y no inoculados (control), crecidas en el suelo A. En los cuatro tiempos de muestreo, Unidades: µg/mL

	T0	T1	T2	T3
Control	1,0	2,25	3,0	2,25
B.pumilus	0,75	4,75	2,75	2,25
B.licheniformis	1,25	5,75	3,0	2,5

Tabla XX. Resultados de pH en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles, crecidas en el suelo B. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

	T0	T1	T2	T3
Control	7,68 ± *0,10*	7,73 ± *0,06*	7,96 ± *0,13*	7,89 ± *0,23*
B.pumilus	7,93 ± *0,14*	7,46 ± *0,31*	7,83 ± *0,08*	7,28 ± *0,11*

	T0	T1	T2	T3
Control	7,93 ± *0,19*	7,97 ± *0,34*	7,93 ± *0,10*	8,08 ± *0,20*
B.licheniformis	8,12 ± *0,26*	8,14 ± *0,16*	7,97 ± *0,11*	8,59 ± *0,21*

Tabla XXI. Resultados de nitrogeno nitrato en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	5,70 ± *2,20*	4,20 ± *0,16*	3,20 ± *0,48*	5,60 ± *1,30*
B.pumilus	3,30 ± *0,88*	5,75 ± *0,61*	3,75 ± *0,93*	6,85 ± *0,53*

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	4,80 ± *1,22*	6,15 ± *1,70*	1,60 ± *1,22*	6,90 ± *2,36*
B.licheniformis	5,45 ± *0,12*	4,90 ± *0,00*	6,05 ± *0,61*	11,5 ± *2,53*

Tabla XXII. Resultados de nitrógeno total ($N\text{-}NH_4^+$) en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	0,70 ± *0,07*	0,74 ± *0,13*	0,55 ± *0,08*	0,75 ± *0,09*
B.pumilus	0,33 ± *0,13*	0,80 ± *0,03*	0,76 ± *0,06*	0,79± *0,008*

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	0,15 ± *0,04*	0,15 ± *0,008*	0,16± *0,008*	0,14 ± *0,03*
B.licheniformis	0,12 ± *0,01*	0,12 ± *0,04*	0,22 ± *0,03*	0,40 ± *0,08*

Tabla XXIII. Resultados carbono orgánico en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

	T0	T1	T2	T3
Control	0,10 ± *0,008*	0,10 ± *0,008*	0,20 ± *0,016*	0,00 ± *0,000*
B.pumilus	0,20 ± *0,016*	0,20 ± *0,008*	0,29 ± *0,016*	0,20 ± *0,010*

	T0	T1	T2	T3
Control	0,10 ± *0,008*	0,10 ± *0,008*	0,20 ± *0,016*	0,00 ± *0,000*
B.licheniformis	0,00 ± *0,000*	0,00 ± *0,000*	0,20 ± *0,000*	0,19 ± *0,010*

Tabla XXIV. Resultados de proteínas en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	$3{,}4x10^{-2}$±*0,00*	$3{,}5x10^{-2}$±*0,12*	$4{,}4x10^{-2}$±*0,32*	$3{,}2x10^{-2}$±*0,20*
B.pumilus	$2{,}9x10^{-2}$±*0,27*	$4{,}2x10^{-2}$±*1,10*	$3{,}2x10^{-2}$±*0,20*	$4{,}0x10^{-2}$±*0,00*

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	$3{,}4x10^{-2}$±*0,69*	$3{,}2x10^{-2}$±*0,20*	$3{,}2x10^{-2}$±*0,20*	$7{,}0x10^{-2}$±*0,61*
B.licheniformis	$4{,}8x10^{-2}$±*0,00*	$3{,}8x10^{-2}$±*0,77*	$6{,}6x10^{-2}$±*1,23*	$9{,}2x10^{-2}$±*1,83*

Tabla XXV, Resultados de azúcares totales en los exudados procedentes de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* o *B.licheniformis* y sus respectivos controles no inoculados, crecidas en el suelo B. Los resultados son la media de tres valores. El error estandar aparece en cursiva.

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	7,0 ± *7,00*	7,0 ± *0,00*	4,0 ± *2,20*	7,5 ± *2,85*
B.pumilus	4,0 ± *13,0*	13,0 ± *6,53*	5,0 ± *0,81*	22,5 ± *6,90*

µg/mL	T0	T1	T2	T3
Control	4,49 ± *7,00*	7,0 ± *0,00*	18,5 ± *3,60*	28,5 ± *0,40*
B.licheniformis	28,0 ± *12,5*	12,5 ± *6,94*	29,5 ± *9,30*	20,5 ± *5,07*

Tabla XXVI. Contenido en lípidos de los exudados extraídos de plántulas de aliso inoculadas con *B.pumilus* y *B.licheniformis* y no inoculados (control), crecidas en el suelo B. En los cuatro tiempos de muestreo, Unidades: µg/mL

	T0	T1	T2	T3
Control	8,0	4,75	6,52	10,0
B.pumilus	1,75	10,75	4,47	8,25
B.licheniformis	8,75	9,0	7,5	9,27

APENDICE 3

Tabla I. Datos de longitud aérea correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. Recta de regresión y coeficiente de correlacion (r). * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

L.A. (cm)	CTRL	10X	20X	40X	80X	Regresión	r
GA_3	2.82 ±0.08a	5.00 ±0.33b	5.39 ±0.07b	7.57 ±0.62c	*	y = 3.55 + 0.101x	87.0 %
B.pumilus	2.82 ±0.08a	**	3.38 ±0.06a	3.10 ±0.61a	5.05 ±0.23b	y = 2.65 + 0.027x	82.7 %
B.licheniformis	2.82 ±0.08a	3.26 ±0.35ab	4.08 ±0.12b	**	5.42 ±0.24c	y = 3.04 + 0.031x	93.8 %
CTRLsin PCB	6.53 ±0.17						

Tabla II. Datos de longitud aérea del brote, correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. Recta de regresión y coeficiente de correlacion (r) * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

L. brote (cm)	CTRL	10X	20X	40X	80X	Regression	r
GA_3	0	2.5 ±0.33a	1.38 ±0.47a	5.26 ±0.95b	*	y = 0.661 + 0.107x	77.8%
B.pumilus	0	**	1.33 ±0.27a	1.35 ±0.36a	3.07 ±0.02b	y = 0.188 + 0.036x	93.9%
B.licheniformis	0	1.51±0.41a	1.84 ±0.23a	**	3.26 ±0.05b	y = 0.719 + 0.034x	82.6%

Tabla III. Datos de superficie aérea del brote correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. Recta de regresión y coeficiente de correlacion (r) * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

S.brote (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X	Regresión	r
GA_3	0	4.98±1.52a	3.81±1.74a	4.07±0.21b	*	y = 2.29 + 0.057x	21.4%
B.pumilus	0	**	1.68±0.49a	2.00±0.78a	6.2±0.08b	y = - 0.30 + 0.084x	94.2%
B.licheniformis	0	2.17±0.51a	3.35±0.27a	**	7.17±0.89b	y =1.08 + 0.08x	90.6%

Tabla IV. Datos de superficie aérea correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. Recta de regresión y coeficiente de correlacion (r). * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

S.A. (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X	Regresión	r
GA_3	$4.78±1.03^a$	$7.45±1.66^b$	$8.07±1.58^b$	$6.38±0.88^{ab}$	*	y = 6.18 + 0.028x	10.7%
B.pumilus	$4.78±1.03^a$	**	$3.48±0.13^a$	$3.95±1.41^a$	$9.59±0.25^b$	y = 3.13 + 0.067x	65.0%
B.licheniformis	$4.78±1.03^a$	$4.17±0.7^a$	$5.68±0.07^a$	**	$10.4±0.26^b$	y = 4.13 + 0.077x	96.0%
CTRLsin PCB	27.36±4.56						

Tabla V. Número de hojas del brote correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. de cada tratamiento($p<0.05$). * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

Nº hojas brote	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	0	4.5±0.5a	4.5±0.5a	5±0.0b	*
B.pumilus	0	**	3.6±0.47a	4±0.0a	6±0b
B.licheniformis	0	2.6±0.47a	4.5±0.5b	**	4±0b

Tabla VI. Datos de superficie radical correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

S.R. (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	6.00±0.82	3.76±0.59	2.87±0.62	2.71±0.73	*
B.pumilus	6.00±0.82	**	3.48±0.04	3.22±0.07	5.22±0.82
B.licheniformis	6.00±0.82	3.76±1.22	3.45±0.64	**	4.83±0.21
CTRLsin PCB	7.18±0.22				

Tabla VII. Datos de longitud radical correspondientes a las plantas enanas tratadas con 5, 20 y 40 ppm de GA_3, y a los medios de cultivo de los dos *Bacillus* concentrados 10, 20, 40 y 80 veces. Los datos aparecen como la media de tres valores ± el error estándar. * 80 ppm de GA_3. **Plantas que murieron a lo largo del tratamiento. PCB: paclobutrazol

LR. (cm^2)	CTRL	10X	20X	40X	80X
GA_3	11.61±3.08	6.9±1.29	6.35±0.61	6.38±1.09	*
B.pumilus	11.61±3.08	**	8.21±0.24	7.24±0.71	6.58±0.51
B.licheniformis	11.61±3.08	7.22±1.12	5.72±0.91	**	6.81±0.81
CTRLsin PCB	39.69±7.0				

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

FE DE ERRATAS

Página	Modificación
XII	Figuras 3.13 a 3.20, y 3.23 donde dice "*B.Licheniformis*" debe decir "*B. licheniformis*"
XII	Figura 3.21 donde dice "*B.Pumilus*" debe decir "*B. pumilus*"
XIII	Figura 5.4. donde dice "*B.Licheniformis*" debe decir "*B. licheniformis"*
12	Ultima línea: donde dice "... Brown (1974) observan .." debe decir "...observa"
14	Epígrafe 1.3. donde dice "...rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR)" debe decir "promotoras del crecimiento vegetal"
16	Párrafo 3, línea 3, donde dice "sistéma" debe decir "sistema"
19	Párrafo 1, línea 2, donde dice "*Herbaspirillus*" debe decir "*Herbaspirillum*"
28	Párrafo 1, línea 5, donde dice "Acero, (1994)", debe decir "Acero *et al*, (1994)"
28	Párrafo 2, línea 3, a continuación de "*B. licheniformis*" debe aparecer la cita "Probanza *et al*, (1996)
29	Figura: donde dice PLFAs, debe aparecer PLFAs de suelo. Inoculación: donde dice "10^7 ufc /g suelo" debe decir "10^8 ufc/g suelo"
31	Párrafo 3, línea 4, debe suprimirse "del recipiente"
34	Párrafo 2, última línea, donde dice "mantuvieron" debe decir "mantuvo"
39	Figura: donde dice "SA, LA" debe decir "SA, LA, SR, LR"
41	Párrafo 2. La frase debe terminar en "apartado 2.3.2.", desapareciendo desde "por último..." hasta "resultados" y el párrafo 3.
46	Apartado 2.3.2.2.a, línea 4, donde dice "Es estas" debe decir "en estas"
49	Párrafo 2, donde dice "las dosis, tanto de ...., se repitió" debe decir, "las dosis se repitieron 1 semana después.."
50	Párrafo 3, línea 4, donde dice "análitica" debe decir "analítica"
50	Párrafo 6, línea 1, donde dice "resusupendiendo" debe decir "resuspendiendo"
71	Párrafo 2, línea 5, donde dice "la incorporación de *B.licheniformis* al suelo A no altera.." debe decir "de *B.pumilus* al suelo B no altera..."
90	Párrafo 1, donde dice "(Tabla 3.XVIII)" debe decir "(Tabla XXVIII)"
92	Donde dice (Tabla 3.XXIX y los.." debe decir "(Tabla 3.XXIX)
104	Párrafo 1, línea 8, donde dice "Sin embargo, en primer lugar.." debe decir "En primer lugar.."
108	Párrafo 2, línea 16, donde dice "se ha atribuído.." debe decir "se han atribuído"
110	Párrafo 3, línea 3, donde dice "(Figuras 3.6 y 3.8) con ambos tratamientos" debe decir "(Figuras 3.6 y 3.8). Con ambos tratamientos..."
111	Párrafo 4, línea5, donde dice .."entre controles o son significativos" debe decir " entre controles no son significativos"
112	Párrafo 1, línea 2, donde dice "bacterias" debe decir "cepas"
113	Párrafo 3, línea6, donde dice "..sobre en el desarrollo de la planta" debe decir "sobre el desarrollo de la planta"
119	Párrafo 6, línea 2, donde dice "presenta" debe decir "presentan"
121	Párrafo 5, línea 2, donde dice "mayores" debe decir "menores"
127	Párrafo 1, línea 10, donde dice "mecasnimos" debe decir "mecanismos"
128	Párrafo 1, líneas 1 a 4, desde "la planta .." hasta "..algunas raíces finas resulta" sustituir por las líneas 5 y 6, desde "inevitable, " hasta "lisis celular".
128	Párrafo 4, línea 9, donde dice (citas javier y jones 3696) debe decir (Zhang *et al*, 1997a; Jones, 1998)
142	Párrafo 2, línea 2, donde dice ".. de medio de cultivo de *B.pumilus* (A), y espectro de masas correspondiente a MeTMSi-GA1 en la misma muestra (B), utilizado en la identificación de GA1 en el medio" debe decir".. de medio de cultivo de *B.pumilus*."
150	Párrafo 3, línea 5, donde dice "(1991 de Talón)", debe decir "(1991)"
178	Tabla XVI: longitud radical de control y *B.licheniformis* en el suelo B. Los datos de T0 y T1 están cambiados entre sí.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES