

BIBLIOTECA VIRTUAL

2. MATERIALES Y MÉTODOS



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.)

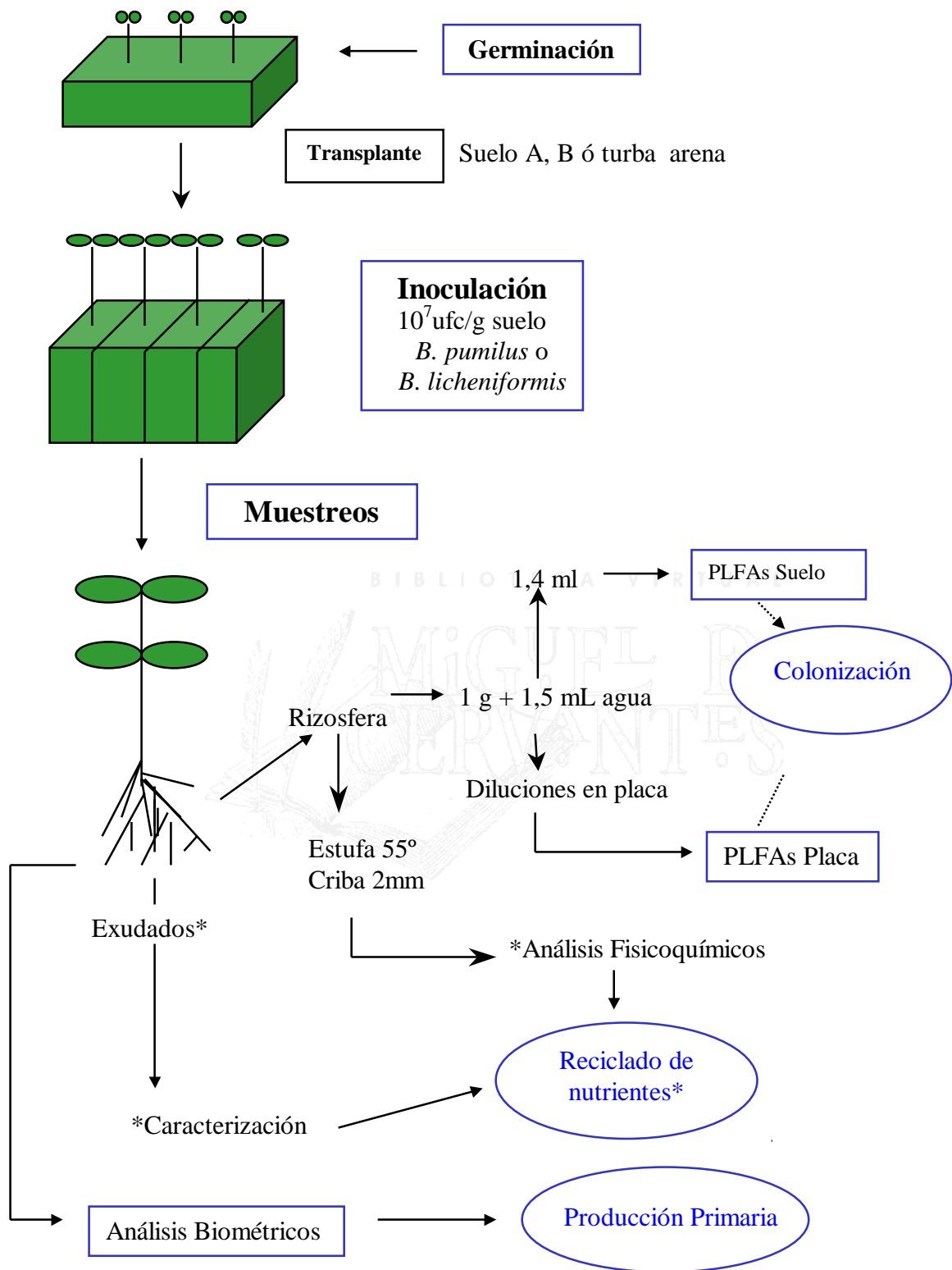


Figura 2.1. Protocolo general de trabajo seguido para la toma de muestras. Estudios de colonización y efectos biológicos. * Sólo en condiciones de laboratorio.

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 °C.

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 °C

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 °C 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 °C/ 18 °C, 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 °C 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 °C 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.).



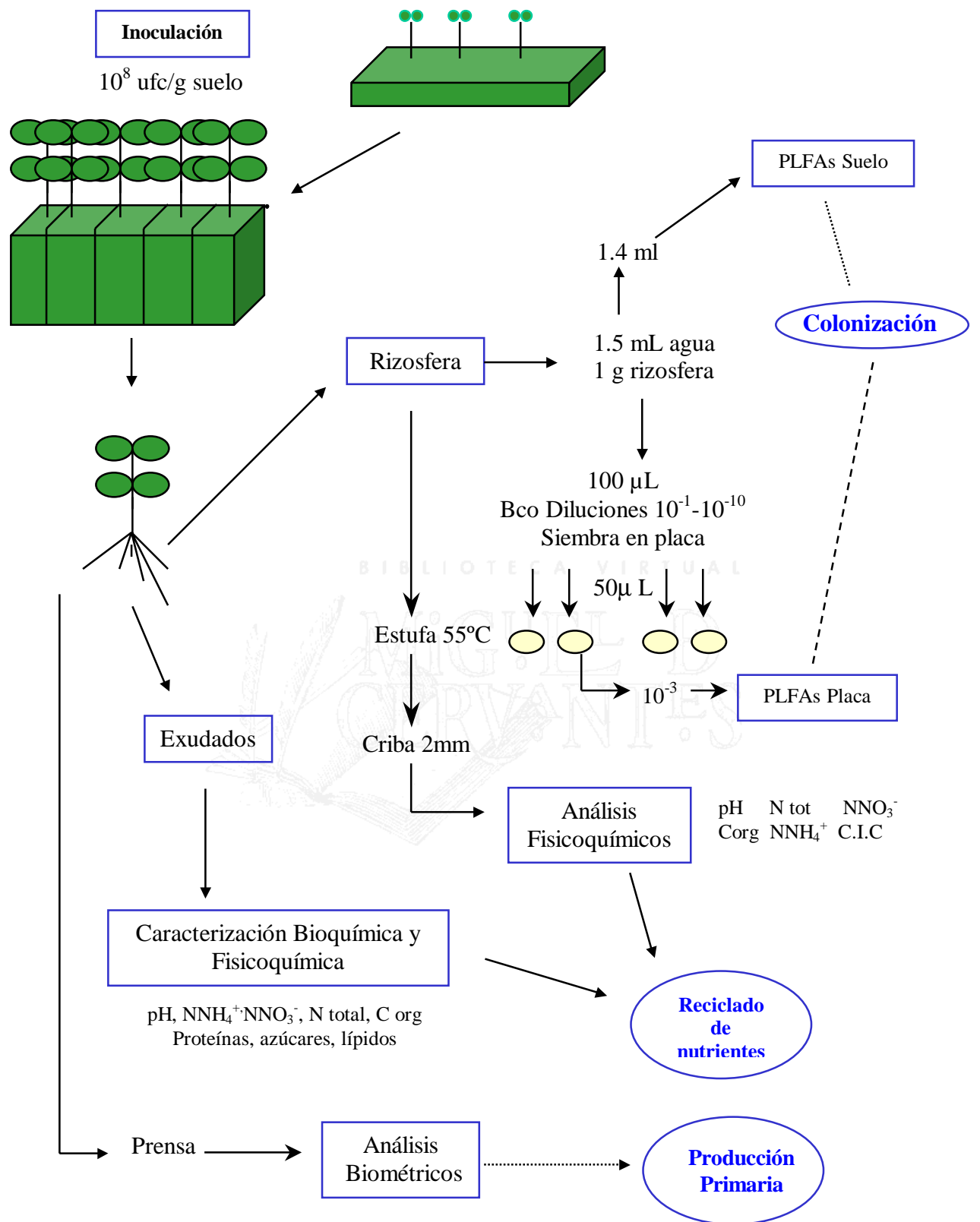


Figura 2.2. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de laboratorio.

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 extraídos 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 °C.

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 centrifuga 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 (4°C) a 1800xg 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 °C. El residuo seco se mantuvo a -20 °C 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 °C 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 °C. El residuo se mantuvo a -20 °C 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 incubó en baño acuoso a 37 °C, durante 15 min. Cuando la mezcla se enfría, se añaden 0,3 mL de ácido acético 1 M, 2 mL de H₂O miliQ y 2 mL de tolueno y se agita en vortex durante 1 min., se centrifuga a 4 °C, 5000xg 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 metilnonadecanoico (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: T^a inyector: 230 °C; T^a detector; 270 °C; T^a horno en gradiente, de 80 °C durante 1 min, hasta 160 °C a una velocidad de 20 °C/min y hasta 270 °C a una velocidad de 5 °C/min. El contragradiente de temperatura hasta 80 °C, a 20 °C/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.

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 Conservación 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 P₂O₅-fosfatos, 100-400 mg/L K₂O- óxido potasio). La mezcla se sometió a tres ciclos de esterilización en autoclave a 120 °C 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 n°3) 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.



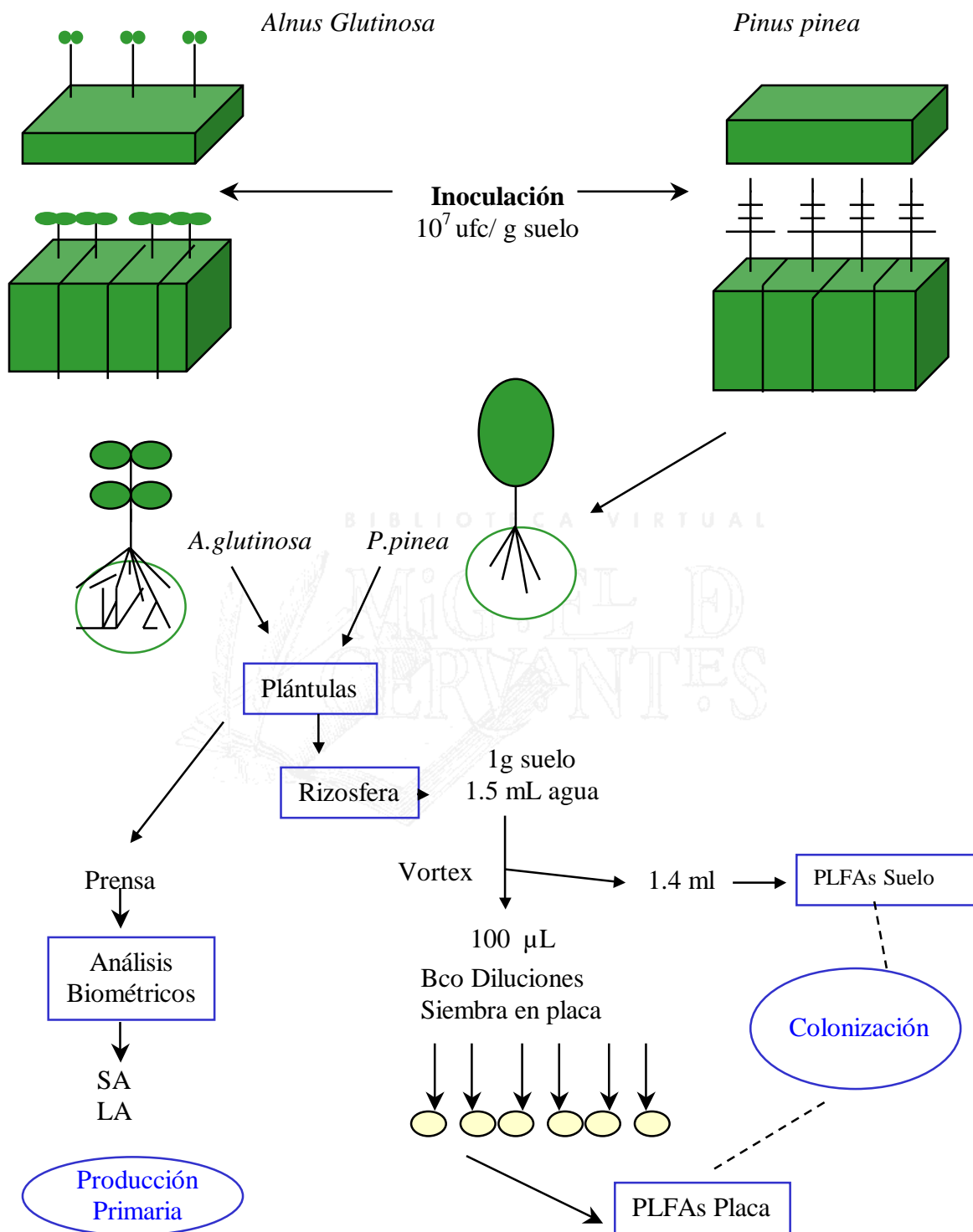


Figura 2.3. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de invernadero

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 °C 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.

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, nitrógeno 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 (citrate 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 fotolorimetría con un fotómetro Merck 502130/SQ118. Los nitratos reaccionan con el nitrospectral para dar un nitrocompuesto de color rojo intenso.

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 °C 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 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 proporción 1:1) y 1,25 mL de reactivo B (tampón fosfato (26,84g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 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 °C 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 centrifuga 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 1800xg; 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 1800xg, 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 °C 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.).

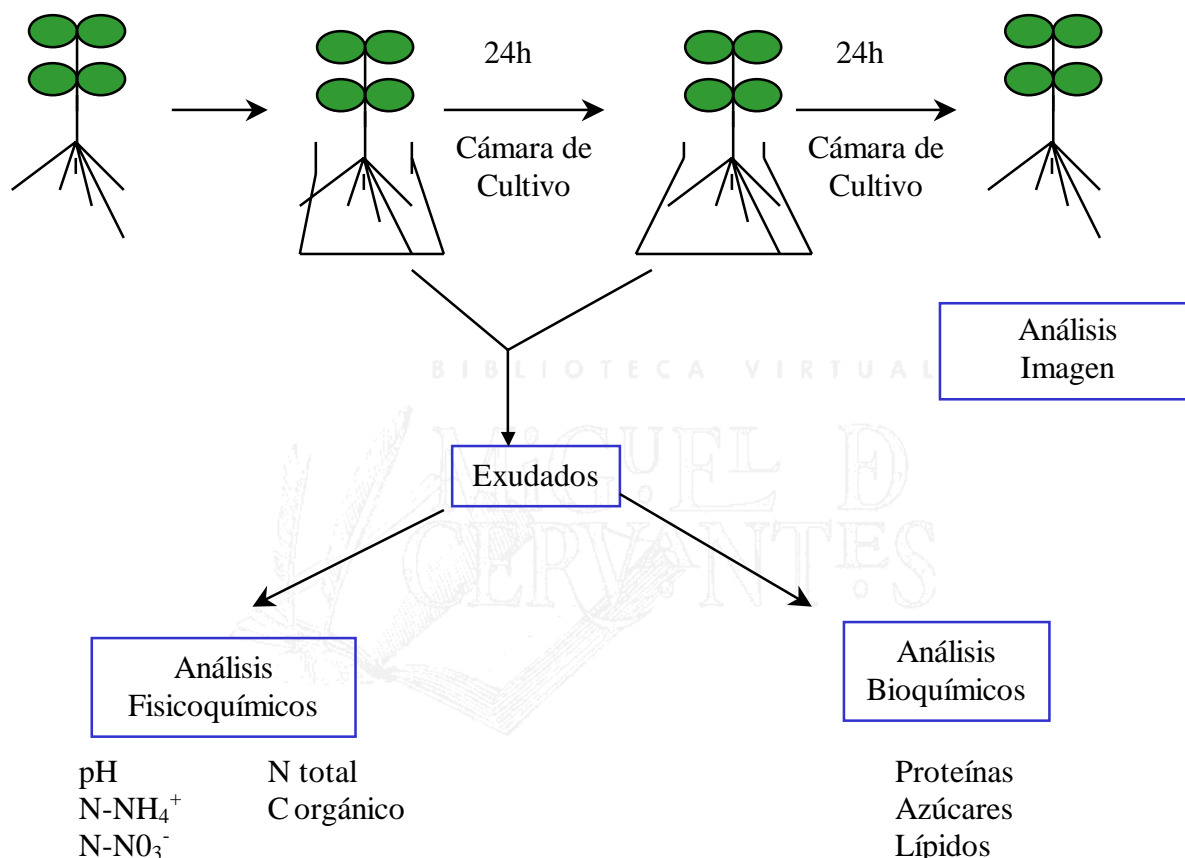


Figura 2.4. Protocolo de obtención y caracterización de exudados

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 °C/18 °C, 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 recolectados, se filtraron al vacío por filtros millipore de 0.4µm, se repartieron en alícuotas y se congelaron a -20 °C para su posterior análisis.

2.3.2.2. Caracterización de los exudados

Los exudados se sometieron a análisis físicoquímico y bioquímico. 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, nitrógeno 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 dicromato 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 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 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 $\text{NH}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$, 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 porcentaje 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. En 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 interpolan en una recta patrón de glucosa (10–100 $\mu\text{g/mL}$) 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 $1800\times g$ 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 μ L 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 GA₃, 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 °C en agitación a 400 rpm en un agitador orbital con campana UNIHOOOD 500. Se centrifugaron a 5000xg 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 GA₃ 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 GA₃ 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).

2.4.3. Caracterización de giberelinas por cromatografía 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 °C. 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 C₁₈.

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 analítica Hypersil C₁₈ (250 x 4,6 mm, 10 µm d.i.), unida a una precolumna también C₁₈. 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 (GA₈, GA₂₉, GA₈₁, GA₃, GA₁, GA₂₀, GA₄₄, GA₁₉, GA₇, GA₄, GA₉ y GA₂₄) 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 °C 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 -80°C.

La metilación de las muestras se realizó resuspendiendo 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 campana de extracción forzada, y luego el MeOH mediante un concentrador a vacío *Speed vacuum*.

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 analizaron 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 (1 μL) 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 $^{\circ}\text{C}$. Después de 1 min, se inició una rampa de ascenso a 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 240 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente esta temperatura se incrementó hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. 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 $^{\circ}\text{C}$, 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 GA₁ 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 estándar interno, se llevó a cabo la cuantificación definitiva. Las concentraciones de GA₃ presentes en los extractos se calcularon generando curvas de concentraciones conocidas de GA₃, considerando las pérdidas de GA₁ presentes en la misma fracción que la GA₃. Las estimas de 3-epiGA₁ e iso GA₃ se obtienen comparando las intensidades de los iones con los isómeros correspondientes (GA₁ y GA₃, respectivamente). Los enriquecimientos de dichos estándares se determinaron mediante GC-MS y éstos fueron: [17-²H₂]GA₁, 99.6 %, [17-²H₂]GA₄, 93.3 %, [17-²H₂]GA₂₀, 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 °C, 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)-GA₁/[²H₂]GA₁ , m/z 506 y 508, (MeTMSi)-GA₄/[²H₂]GA₄ , 284 y 286 m/z , (MeTMSi)-GA₂₀/[²H₂]GA₂₀ , 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



2. MATERIALES Y MÉTODOS

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.)

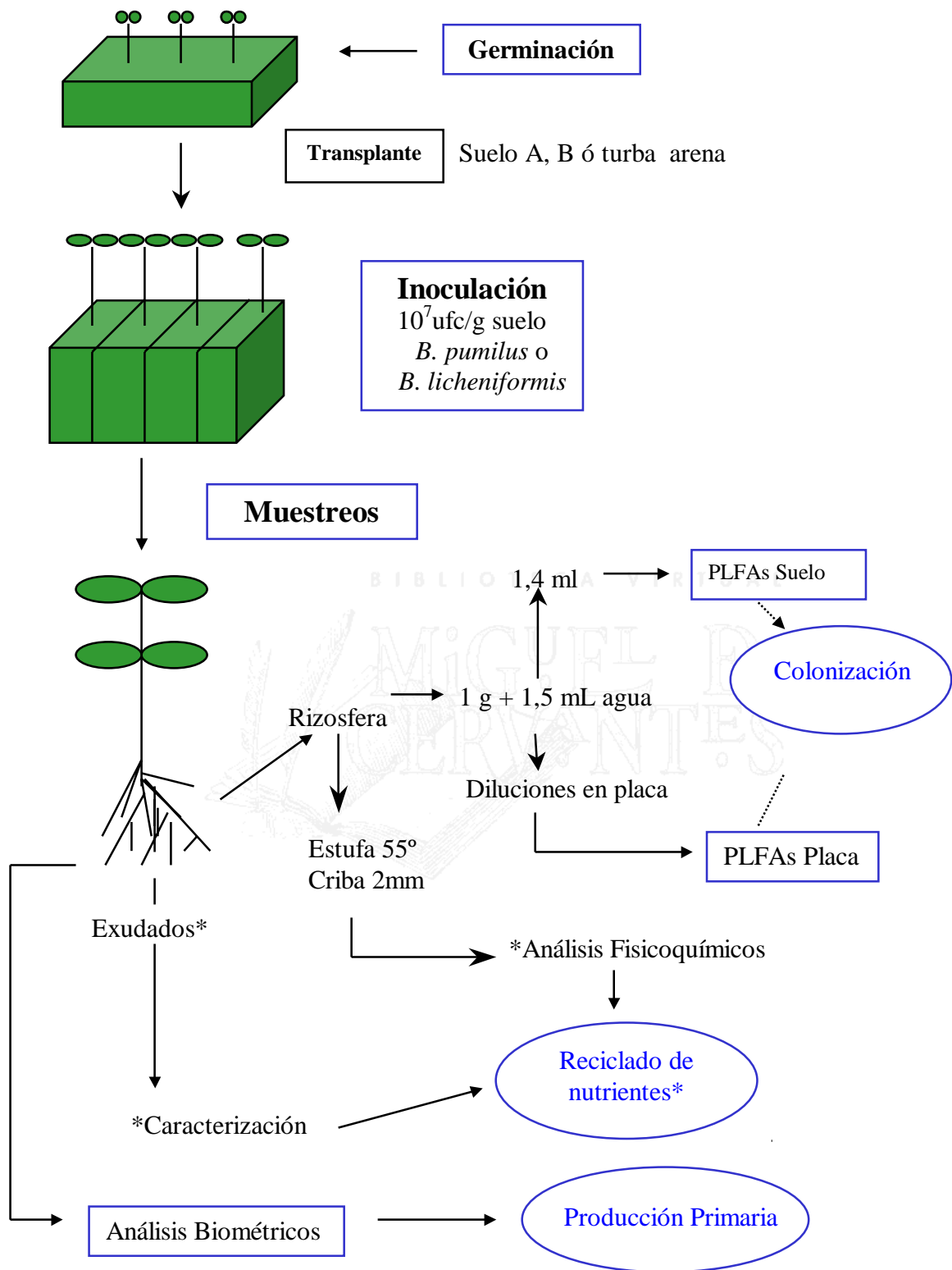


Figura 2.1. Protocolo general de trabajo seguido para la toma de muestras. Estudios de colonización y efectos biológicos. * Sólo en condiciones de laboratorio.

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 °C.

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 °C

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 °C 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 °C/ 18 °C, 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 °C 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 °C 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.).



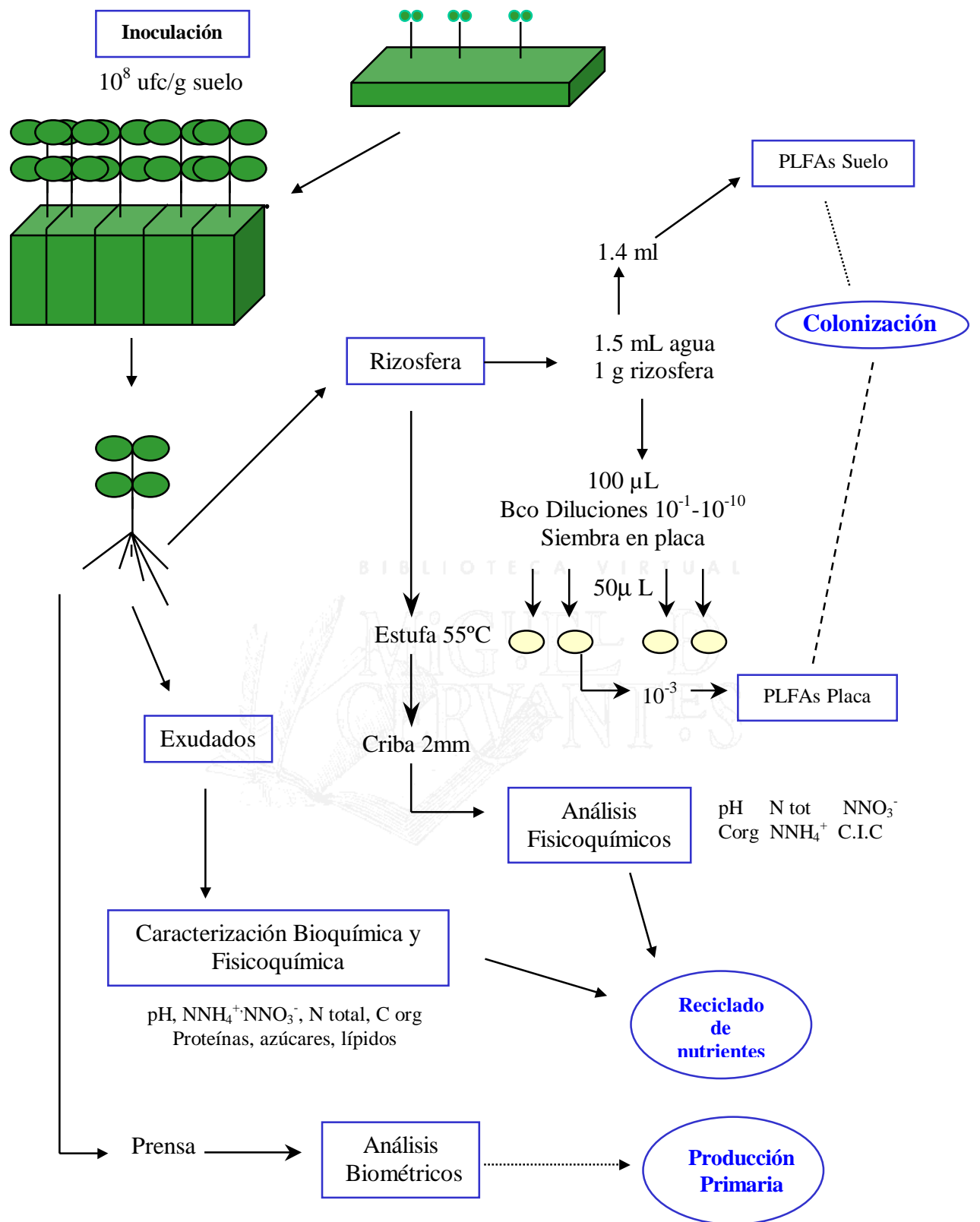


Figura 2.2. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de laboratorio.

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 extraídos 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 °C.

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 centrifuga 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 (4°C) a 1800xg 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 °C. El residuo seco se mantuvo a -20 °C 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 °C 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 °C. El residuo se mantuvo a -20 °C 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 °C, durante 15 min. Cuando la mezcla se enfría, se añaden 0,3 mL de ácido acético 1 M, 2 mL de H₂O miliQ y 2 mL de tolueno y se agita en vortex durante 1 min., se centrifugan a 4 °C, 5000xg 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 metilnonadecanoico (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: T^a inyector: 230 °C; T^a detector; 270 °C; T^a horno en gradiente, de 80 °C durante 1 min, hasta 160 °C a una velocidad de 20 °C/min y hasta 270 °C a una velocidad de 5 °C/min. El contragradiante de temperatura hasta 80 °C, a 20 °C/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.

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 Conservación 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 P₂O₅-fosfatos, 100-400 mg/L K₂O- óxido potasio). La mezcla se sometió a tres ciclos de esterilización en autoclave a 120 °C 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 n°3) 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.



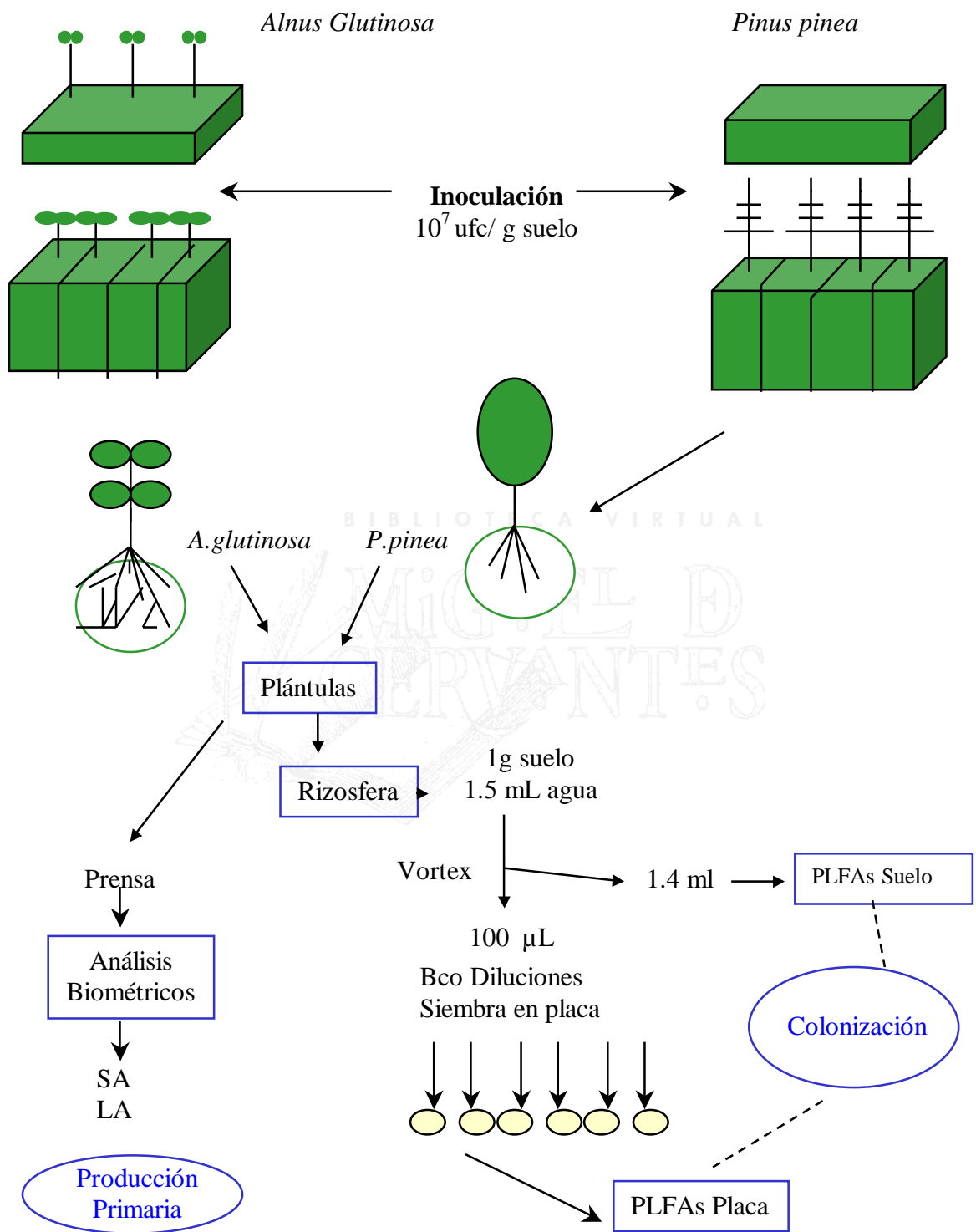


Figura 2.3. Protocolo experimental desarrollado en los ensayos realizados en condiciones de invernadero

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 °C 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.

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, nitrógeno 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 (citrate 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 fotolorimetría con un fotómetro Merck 502130/SQ118. Los nitratos reaccionan con el nitrospectral para dar un nitrocompuesto de color rojo intenso.

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 °C 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 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 proporción 1:1) y 1,25 mL de reactivo B (tampón fosfato (26,84g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 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 °C 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 centrifuga 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 1800xg; 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 1800xg, 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 °C 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.).

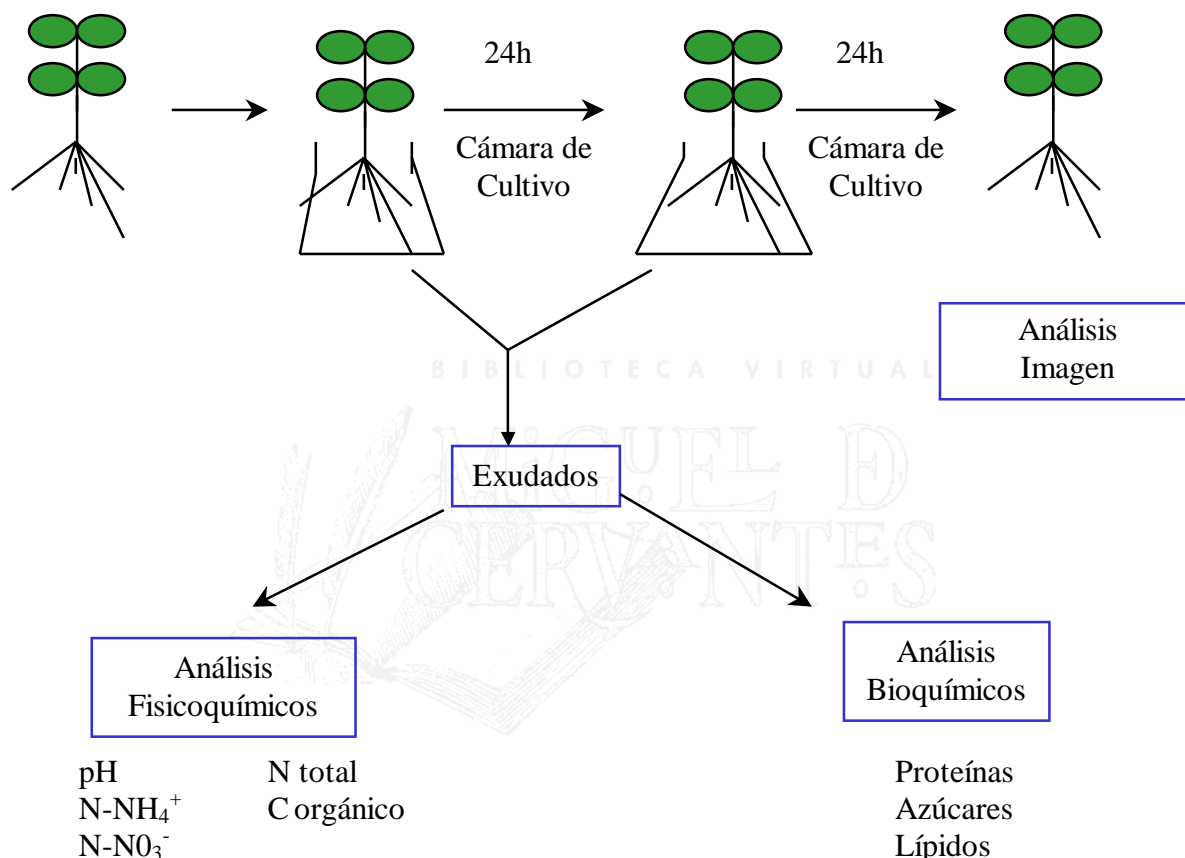


Figura 2.4. Protocolo de obtención y caracterización de exudados

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 °C/18 °C, 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 °C para su posterior análisis.

2.3.2.2. Caracterización de los exudados

Los exudados se sometieron a análisis físicoquímico y bioquímico. 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, nitrógeno 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 dicromato 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 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 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 $\text{NH}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$, 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 porcentaje 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 $\mu\text{g/mL}$) 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 $1800\times g$ 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 μ L 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 GA₃, 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 °C en agitación a 400 rpm en un agitador orbital con campana UNIHOOD 500. Se centrifugaron a 5000xg 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 GA₃ 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 GA₃ como de medio de cultivo bacteriano se repitió 1 semana después de la primera aplicación. A las 2 semanas del comienzo del experimento (1^a 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).

2.4.3. Caracterización de giberelinas por cromatografía 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 °C. 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 C₁₈.

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 analítica Hypersil C₁₈ (250 x 4,6 mm, 10 µm d.i.), unida a una precolumna también C₁₈. 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 (GA₈, GA₂₉, GA₈₁, GA₃, GA₁, GA₂₀, GA₄₄, GA₁₉, GA₇, GA₄, GA₉ y GA₂₄) 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 °C 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 -80°C.

La metilación de las muestras se realizó resuspendiendo 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 campana de extracción forzada, y luego el MeOH mediante un concentrador a vacío *Speed vacuum*.

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 analizaron 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 (1 μL) 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 $^{\circ}\text{C}$. Después de 1 min, se inició una rampa de ascenso a 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 240 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente esta temperatura se incrementó hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. 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 $^{\circ}\text{C}$, 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 GA₁ 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 GA₃ presentes en los extractos se calcularon generando curvas de concentraciones conocidas de GA₃, considerando las pérdidas de GA₁ presentes en la misma fracción que la GA₃. Las estimas de 3-epiGA₁ e iso GA₃ se obtienen comparando las intensidades de los iones con los isómeros correspondientes (GA₁ y GA₃, respectivamente). Los enriquecimientos de dichos estándares se determinaron mediante GC-MS y éstos fueron: [17-²H₂]GA₁, 99.6 %, [17-²H₂]GA₄, 93.3 %, [17-²H₂]GA₂₀, 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 °C, 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)-GA₁/[²H₂]GA₁ , m/z 506 y 508, (MeTMSi)-GA₄/[²H₂]GA₄ , 284 y 286 m/z , (MeTMSi)-GA₂₀/[²H₂]GA₂₀ , 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