

BIBLIOTECA VIRTUAL

MIGUEL D

**8. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LAS RIZOBACTERIAS  
DE *Lupinus luteus* L., *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius*  
L. Y *Lupinus hispanicus* BOISS & REUTER**

### 8.1. Estructura de la comunidad rizobacteriana de *Lupinus luteus* L., *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. y *Lupinus hispanicus* Boiss & Reuter.

En esta parte de la presente memoria se ha realizado un estudio sobre la composición rizobacteriana, a nivel de género, de *Lupinus luteus* L., *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. y *Lupinus hispanicus* Boiss & Reuter, y se ha seguido su evolución desde floración hasta fructificación. Además, con los géneros mayoritarios en cada especie, parcela y momento de muestreo se ha realizado un estudio mediante PCR-RAPDs con el objeto de estudiar la divergencia genética de las cepas bacterianas pertenecientes a dichos géneros.

En cada momento de muestreo se ha realizado un detallado análisis químico del suelo rizosférico sobre el que se desarrollaban las cuatro especies de altramuz estudiadas. Se han incluido en dicho análisis parámetros generales como el nitrógeno total o el carbono orgánico, apropiados para considerar la cantidad y naturaleza de la materia orgánica presente en el sustrato. Se han medido otros más específicos como el nitrógeno nitrato y el nitrógeno amonio, que aportan información sobre la actividad biológica de las poblaciones rizobacterianas que utilizan estos iones como fuente de energía. También se han tenido en cuenta parámetros importantes para estimar el estado del complejo organo-mineral de los suelos, como son la capacidad de intercambio catiónico, la concentración de fósforo y la concentración de cationes de cambio: calcio, magnesio y potasio.

El ACP realizado con los resultados de los análisis químicos demuestra una clara separación tanto entre especies como entre momentos de muestreo (Fig. 6.1). Sobre el eje II se produce la separación por especies y sobre el eje I la separación por momentos de muestreo. Este análisis resulta de gran utilidad, ya que esta ordenación comentada anteriormente nos está indicando una marcada diferencia en las características químicas de cada uno de los suelos. Los factores de carga que más peso tienen en esta ordenación son las concentraciones de calcio y potasio sobre el eje I, y la concentración de potasio y el C.I.C. sobre el eje II. Sin embargo, el ANOVA no detecta diferencias significativas en ninguno de los parámetros excepto en la concentración de potasio en *L.angustifolius*. El ACP, por lo tanto, nos permite en este caso detectar variaciones de conjunto en los

suelos estudiados. Estas variaciones a nivel rizosférico vienen determinadas fundamentalmente por la fuente primaria de energía en el sistema: la planta. Dichas variaciones deben provocar cambios importantes en la composición cenótica de las poblaciones bacterianas asociadas a las raíces.

El método seguido para el aislamiento bacteriano, mediante suspensiones/diluciones y posterior siembra de los mismos en medios enriquecidos, es un procedimiento estándar en los estudios de microbiología del suelo (Probanza *et al.*, 1996; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996). Debido a la complejidad y variabilidad del ambiente radical, ningún medio de cultivo es adecuado para el crecimiento de todas las bacterias edáficas, puesto que se desconocen los requerimientos nutricionales de muchas cepas. Se ha estimado que sólo entre un 0,3 % y un 20 % de las bacterias del suelo son cultivables (Alexander, 1977; Torsvik *et al.*, 1990) y si hablamos de la rizosfera, este porcentaje se sitúa entre el 1 y el 10 % (Campbell y Greaves, 1990). De este modo, cuando hablamos del número total de bacterias en una muestra de suelo nos referimos a una fracción del total. Sin embargo, al ser éste un método seguido por muchos investigadores podemos comparar nuestros datos con los obtenidos por otros autores.

Para la determinación de los géneros bacterianos, se siguió el esquema diagnóstico de Acero *et al.* (1994) modificado, que se desarrolla mediante pruebas bioquímicas y siembra en medios de cultivo selectivos.

Considerando globalmente los análisis realizados en todas las parcelas y momentos de muestreo en las cuatro especies, las bacterias Gram (+) son siempre mayoritarias, y dentro de éstas lo son siempre el grupo formado por los tres géneros de Gram (+) no esporuladas: *Aureobacterium*, *Arthrobacter* y *Cellulomonas* (Figs. 6.2, 6.4, 6.6 y 6.8). En cuanto a esto existe cierta confusión; así, mientras autores como Kloepper (1993) indican que las bacterias Gram (-) son las más abundantes en el suelo, otros como Atlas y Bartha (1993) indican justamente lo contrario, es decir, que son las Gram (+) las que predominan. No podemos olvidarnos que el factor determinante de la composición rizobacteriana de las plantas es la presión selectiva que éstas ejercen a través de los exudados radicales, y que las características de dichos exudados están influidas por una gran cantidad de factores bióticos y abióticos que alteran su composición (Grayston *et al.*, 1996). Por lo tanto, difícilmente se pueden generalizar este tipo de estudios sin tener

en cuenta un gran número de factores como son el tipo de planta, tipo de suelo sobre el que se desarrolla, estado fisiológico, etc., ya que la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales depende, en definitiva, de la interacción de todos los factores mencionados.

*L.hispanicus* no muestra diferencias significativas de T1 a T2 en los porcentajes de ninguno de los géneros bacterianos aislados de su rizosfera (Fig. 6.7), en las demás especies las variaciones son poco representativas. Sólo hay que destacar el caso de *L.albus* que sí muestra una importante diferencia de un tiempo a otro de muestreo: *Bacillus*, *Aureobacterium* y *Pseudomonas* disminuyen significativamente, mientras que *Cellulomonas* y *Arthrobacter* aumentan (Fig. 6.5). Este cambio, que sólo se detecta en esta especie, debe estar directamente relacionado con una alteración en la composición cualitativa y cuantitativa de los productos liberados por las raíces. En este sentido, conviene señalar que los análisis de *L.albus* y *L.luteus* mostraron que el cambio cuantitativo que se producía en la mayoría de los parámetros medidos de T1 a T2 era mucho más acusado en *L.albus* que en *L.luteus*. Entre los factores que más afectan a la exudación radical podemos citar la edad y el estado de desarrollo de la planta (Hale *et al.*, 1978). Las variaciones de los patrones de exudación según el estado fenológico de la planta (Waschützu *et al.*, 1992; Mozafar *et al.*, 1992) pueden modificar los patrones de crecimiento de la población rizosférica y su actividad fisiológica (Griffin *et al.*, 1976; Foster, 1982; Newman, 1985).

Nuestros resultados sugieren que las alteraciones que se producen en la composición de los exudados de floración a fructificación, es variable según la especie, aunque también los cambios morfológicos sufridos por las plantas entre floración y fructificación, usados por nosotros para determinar el momento de muestreo, no coinciden en el tiempo con el cambio cualitativo que se produce en la exudación radical.

El estudio de la composición microbiana rizosférica, se plantea con el objeto de conocer el modelo de variación sucesional que ocurre en este sistema, en el que la planta tiene, probablemente, un control decisivo, hasta el extremo que autores como Chanway y Nelson (1991) sugieren una especificidad a nivel de genotipo entre bacteria y planta. El conocimiento de la estructura de la comunidad microbiana de la rizosfera, los fenómenos de sucesión y estrategias de crecimiento son esenciales para poder hacer uso de agentes

biológicos como mejoradores de ciertos cultivos, tanto desde el punto de vista del impacto que las inoculaciones inducen en el equilibrio del sistema, como para asegurar el éxito de las colonizaciones (Gilbert *et al.*, 1996; Leggett *et al.*, 1996).

En el mismo planteamiento descrito entra el método de trabajo desarrollado para la obtención de cepas promotoras del crecimiento (PGPRs), es decir, simultáneamente al estudio de la estructura de la comunidad bacteriana rizosférica, obtenemos el material de trabajo para realizar las pruebas biológicas que nos permiten aislar, si existen, cepas promotoras del crecimiento.

Aunque sólo un pequeño porcentaje de la comunidad bacteriana del suelo es capaz de crecer en un medio sintético (Colwell *et al.*, 1985), los aislados obtenidos mediante los métodos de cultivo en placa han sido a menudo considerados una parte representativa de la comunidad bacteriana, que puede ser usada para indicar tendencias del conjunto de la comunidad que se desarrolla en la rizosfera (Gilbert *et al.*, 1993; Kennedy y Smith, 1995). Otros estudios de sucesión, también sobre la estructura o actividad de las comunidades de la rizosfera, han utilizado diferentes metodologías experimentales como la consideración de capacidades metabólicas a través del sistema BIOLOG (Garland y Mills, 1991), o a través de la incorporación de precursores radiactivos (Bååth, 1992). El uso de modelos basados en las pautas de crecimiento de las poblaciones como el parámetro  $\lambda$  (Bååth *et al.*, 1988), o la ecuación de Shannon Weaver, o el aislado de colonias en cortos periodos de tiempo (De Leij *et al.*, 1993), o en placas BIOLOG (Fuller *et al.*, 1997), han sido usados con este mismo propósito. Otras aproximaciones al estudio de la estructura rizosférica incluyen identificación de géneros bacterianos mediante el perfil de FAMES (Lilley *et al.*, 1996). En el presente estudio, los aislados han sido identificados hasta el nivel de género mediante pruebas bioquímicas clásicas, similares a los métodos descritos por Degens y Harris (1997). Además, la velocidad de crecimiento de las bacterias en las placas ha sido considerada como un indicador del estado fisiológico de las células en el ambiente, de la disponibilidad de nutrientes y de las estrategias adaptativas relacionadas con la competitividad (De Leij *et al.*, 1993).

En primer lugar, el estudio de la diversidad mediante el empleo del índice de Shannon permite no sólo conocer los valores de la misma, sino también determinar un tamaño de muestra representativo.

El análisis de los índices de Shannon como parámetro de evaluación de la diversidad de la rizosfera confirma que el tamaño de la muestra es representativo. El número mínimo de aislados necesario para aceptar que el tamaño de la muestra es apropiado, se determina por el valor máximo del índice de Shannon o por su valor asintótico. La cantidad mínima de aislados varía, dependiendo de la especie y del estado de crecimiento de la planta; este valor se mueve entre 54 en *L.angustifolius* T1 y 18 en *L.luteus* T1 (Fig. 6.10). Otros autores estiman un tamaño mínimo de muestra de entre 40 a 80 aislados en *Beta vulgaris* (Lilley *et al.*, 1996), y de entre 20 y 30 en muestras de sedimentos de playas (Bianchi y Bianchi, 1982).

Como ya se indicó en material y métodos, las bacterias se recogieron en dos periodos, 0-36 y 36-72 h, de crecimiento del cultivo. Este planteamiento nos permite identificar las estrategias de crecimiento de las cepas bacterianas aisladas, r o K.

El concepto de estrategias de crecimiento r/K (Luckinbill, 1978) se deriva de los postulados de la ecología evolutiva, la cual indica que las diferencias genéticas entre los organismos son las que proporcionan a éstas sus capacidades para explotar y sobrevivir en los diferentes ambientes (Pianka, 1970; Luckinbill, 1978). Nuestros resultados después de 36 h de incubación (Tabla 6.VIII) muestran que *Aureobacterium* era el género predominante (31,43 %) seguido de *Bacillus* y *Cellulomonas* (23,67 % y 18,69 %, respectivamente); entre las 36 y las 72 h (Tabla 6.XII), la frecuencia de *Aureobacterium* aumenta considerablemente de 31,43 % a 52,21 %, mientras que las frecuencias de *Bacillus* y *Cellulomonas* disminuyen significativamente (4,82 % y 7,66 %, respectivamente). Asumiendo que la velocidad de crecimiento en placa es un parámetro válido para diferenciar los estrategias r y K, *Aureobacterium* puede ser considerado un estrategia de la K, mientras que *Cellulomonas* y *Bacillus* pertenecen a los estrategias de la r. De acuerdo a este criterio, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* podrían ser considerados como estrategias de la K, afirmación que es apoyada por la representación de los ACPs efectuados con los resultados obtenidos a las 36 h y entre 36 y 72 h ( Figs. 6.12 y 6.13).

Considerando todos los aislados, 576, el ACP (resultados tras 72 h, Fig. 6.11) muestra que la composición microbiana rizosférica de *L.albus* es la única que cambia considerablemente de T1 a T2. Estos cambios pueden ser también observados en las representaciones de los ACPs realizados con los resultados obtenidos a las 36 h y entre 36 y 72 h ( Figs. 6.12 y 6.13) y son causados por el aumento de *Cellulomonas*

(estrategas de la r), paralelamente a la disminución de *Aureobacterium*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* (estrategas de la K) en T2. De Leij *et al.* (1993) encuentra que los exudados de raíces jóvenes son ricos en azúcares sencillos y aminoácidos (Curl y Truelove, 1986), proporcionando un medio rico en nutrientes fácilmente asimilables, el cual no está demasiado poblado, y por consiguiente, especialmente favorable para los estrategias de la r. Sin embargo, el medio que proporcionan las raíces viejas no es tan rico en nutrientes y las fuentes de carbono son más recalcitrantes para los microorganismos, propiciando el desarrollo de estrategias de la K.

Estos resultados parecen ser contradictorios con los nuestros, pero debe tenerse en cuenta que De Leij *et al.* (1993) trabaja con raíces jóvenes de trigo, esto es, en etapas muy tempranas del crecimiento en comparación con la floración (T1 en nuestro estudio). Estamos de acuerdo con De Leij *et al.* (1993) en que en etapas tempranas del crecimiento, el desarrollo de los estrategias de la r se incrementa y éstos son progresivamente sustituidos por estrategias de la K. No obstante, durante la necrosis radical que habitualmente ocurre durante la fructificación (T2) en plantas anuales, una amplia y abundante cantidad de compuestos orgánicos son liberados, favoreciendo un nuevo incremento de los estrategias de la r. En leguminosas anuales, como *Vicia villosa*, la necrosis de la raíz se observa durante la fructificación con el subsiguiente incremento en la actividad biológica de diversos grupos de bacterias (Lucas García *et al.*, 1997). Otros estudios apoyan el desarrollo de los estrategias de la r cuando la exudación radical se incrementa (Andrews y Harris, 1986).

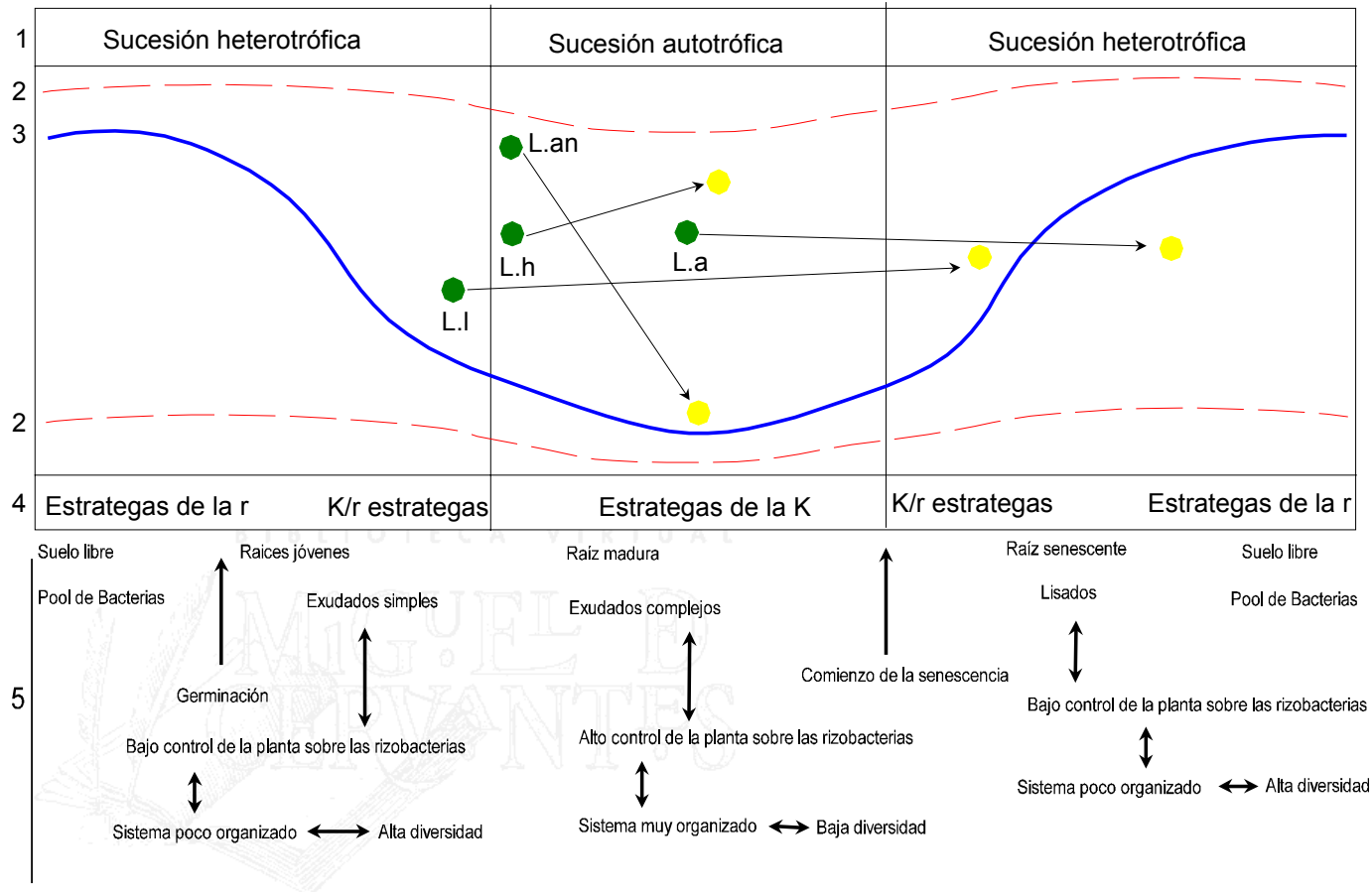
Las frecuencias de los estrategias r/K revelan diferentes estrategias de crecimiento de la comunidad bacteriana de la rizosfera bajo cada especie de *Lupinus*. En *L.albus*, los estrategias de la K predominan en T1, mientras que los estrategias de la r predominan en T2 (Fig. 8.1). En *L.luteus* no hay predominancia de ninguno de los estrategias ni en T1 ni en T2, y en *L.hispanicus* así como en *L.angustifolius*, los estrategias de la K predominan en ambos momentos de muestreo (Fig. 8.1). La literatura indica que la relación entre estrategias r y K revela el estado fisiológico de la raíz. En *L.albus* la necrosis de la raíz está más avanzada que en otras especies, la planta ha perdido el control de la exudación y los compuestos orgánicos son proporcionados por la necrosis radical. Por otro lado, en *L.hispanicus* y *L.angustifolius* todavía controlan la exudación de la raíz y permiten el

predominio de especialistas, los estrategas de la K. La codominancia de estrategias r/K en *L.luteus* indican una situación intermedia.

De acuerdo con otros autores, la rizosfera es un medio muy selectivo, donde la diversidad es menor que en el suelo libre (Marilley *et al.*, 1998). Sin embargo, el cambio en las estrategias de crecimiento detectada entre floración y fructificación en la rizosfera de *L.albus*, reflejada en el predominio de estrategias K y r, respectivamente, tiene que estar asociado a una disminución en la diversidad biológica. Por el contrario, la estrategia de crecimiento permanece invariable en *L.hispanicus* y en *L.angustifolius*, y no debería estar asociado a cambios notorios en la diversidad bacteriana. Esto señala que la diversidad bacteriana detectada nivel genérico no es representativa de la situación real en la rizosfera, y sugiere la necesidad de trabajar no sólo a nivel de especie, sino a nivel de cepa. Todo lo anteriormente dicho es apoyado por la Teoría Ecológica aplicada a diversos sistemas de la rizosfera: una baja diversidad indica una alta conectancia y desarrollo de competencias, y debe estar relacionado con el predominio de los estrategas de la r, y no con los de la K.

A la vista de los resultados se propone un modelo sucesional de la rizosfera de las cuatro especies de *Lupinus* estudiadas. Dicho modelo se construye, relacionando la fisiología de las plantas y los tipos de sucesión en cada momento, con las variaciones encontradas en la diversidad rizobacteriana a nivel de género y las estrategias de crecimiento de dichas rizobacterias (r/K).

En la Figura 8.1, que ilustra el modelo, se representa el tipo de sucesión que se da en cada momento (1) y el estado fisiológico que acompaña a cada tipo de sucesión (5), así como las estrategias de crecimiento de las rizobacterias en relación con el momento fisiológico en el que se encuentran las plantas (4). Además, se ha representado, en la franja delimitada por las dos líneas rojas discontinuas (2), a las dos etapas de muestreo de cada especie de *Lupinus* considerando el valor de diversidad rizobacteriana encontrada en cada una de ellas. La línea azul (3), indica la hipotética variación de diversidad que debe producirse a nivel de cepa.



**Figura 8.1.** Modelo sucesional propuesto para la rizosfera de las cuatro especies de *Lupinus* estudiadas entre los dos momentos de muestreo, relacionando la fisiología de las plantas con las estrategias de crecimiento rizobacterianas, r y K, y con la diversidad biológica. 1. Tipo de sucesión. 2. Diversidad Biológica a nivel de género. 3. Diversidad Biológica a nivel de cepa 4. Estrategias de crecimiento de las bacterias. 5. Estado fisiológico de las plantas y su relación con el tipo de exudación. ●: Tiempo 1, ●: Tiempo 2. L.l (*Lupinus luteus*), L.a (*Lupinus albus*), L.h (*Lupinus hispanicus*), L.an (*Lupinus angustifolius*).

A la vista de estos resultados, pensamos que la relación diversidad-conectancia-estrategias r/K en la rizosfera es contraria a lo descrito para otros sistemas: una baja diversidad estaría relacionada con el predominio de los estrategias de la K, retroalimentación por sobrepoblación y limitación de fuentes de energía, mientras que una alta diversidad estaría representada por un predominio de estrategias de la r. En este sistema, la planta ejerce un fuerte control de la situación, dado su papel como productor primario con la particularidad que las diferentes fuentes de carbono son proporcionadas de acuerdo con el estado fisiológico del momento.

Sin embargo, considerando el actual conocimiento sobre la Teoría Ecológica en la rizosfera, muchos de los aspectos estructurales y funcionales descritos para otros sistemas naturales tendrán que ser descartados para este sistema. Como ejemplo, la sucesión en la rizosfera es definida por un sucesión autotrófica sustentada por la exudación radical, unida a otra sucesión heterotrófica sustentada por la necrosis de la raíz, con la correspondiente conversión de suelo rizosférico a suelo libre.

## **8.2. Divergencia genética de los géneros mayoritarios encontrados en la rizosfera de *Lupinus luteus* L., *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. y *Lupinus hispanicus* Boiss & Reuter.**

La clasificación e identificación de las cepas rizosféricas ha constituido históricamente un problema, debido a que en muchas ocasiones los métodos bioquímicos tradicionales no permitían diferenciar cepas de una misma especie aún con diferentes capacidades metabólicas. En el ambiente rizosférico, el papel fisiológico de las cepas bacterianas es función de sus capacidades metabólicas, lo que a su vez puede venir determinado por procesos de adaptación, constituyendo una ventaja competitiva (Martin-Kearley *et al.*, 1994). Este hecho es frecuente por la fuerte presión que impone el ambiente radical en los procesos de adaptación y selección y de manera directa o indirecta puede alterar decisivamente la fisiología de las plantas (van Overbeek y van Elsas, 1995).

La información bioquímica que proporcionan las pruebas taxonómicas clásicas (Gram, capacidad de esporulación, capacidad de crecer en aerobiosis, morfología celular y de la colonia o respuesta a test bioquímicos), es útil para obtener información sobre la

fisiología de los microorganismos, y a través de ésta de su interacción con el ambiente. Sin embargo, numerosos estudios revelan una diversidad genética elevada entre cepas cuyas características, permiten integrarlas dentro de una misma especie (Selander *et al.*, 1986). Estas características bioquímicas y morfológicas se han conservado y sin embargo, ha producido una divergencia de su ADN (Bell y Friedman, 1994). Este hecho parece habitual en el ambiente rizosférico; por ello, parece imprescindible el uso de técnicas moleculares que nos permitan diferenciar cepas rizosféricas de la misma especie. En este sentido, entre las técnicas más recientemente desarrolladas, podemos citar: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis en campo pulsado (PFGE), análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (AFLP), cebado arbitrario-PCR (AP-PCR), amplificación al azar de polimorfismos de ADN (RAPD), amplificación de secuencias repetitivas y altamente conservadas (rep-PCR, eric-PCR y box-PCR), secuenciación de ADN, etc. (Swings, 1995; Rademaker y Bruijn, 1997). En la Figura 8.2 se muestra esquemáticamente el grado de resolución obtenido con algunas de las técnicas mencionadas anteriormente.

Técnica	Familia	Género	Especie	Cepa
Secuenciación ADN				
RFLP, LFRFA, PFGE				
AFLP, RAPDs, AP-PCR				
Secuenciación 16S rADN				
% G+C				
Hibridación ADN-ADN				
Hibridación ADN-ARN				
Amplificación de fragmentos rep, eric y box				

**Figura 8.2.** Resolución de algunas técnicas usadas normalmente en taxonomía microbiana (modificada de Swings, 1995)

Las técnicas genéticas pueden ser divididas en tres grupos. El primero comprende una serie de técnicas como RFLP y LFRFA que se basan en la utilización de enzimas de restricción, pero no utilizan PCR. Un segundo grupo como AFLP utilizan en combinación las enzimas de restricción y la PCR. Por último hay un grupo de técnicas como RAPDs, que están basadas únicamente en el empleo de la PCR. Todas estas técnicas están teniendo una rapidísima evolución, y están haciendo posible un avance muy rápido en el campo de la taxonomía microbiana.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) se ha convertido en una útil herramienta en estudios de microecología. Las aplicaciones de la PCR han aumentado considerablemente en estos últimos años. Una de estas aplicaciones consiste en la amplificación del ADN con cebadores (“primers”) de secuencia arbitraria, de forma que la amplificación rinde fragmentos de ADN de un peso molecular característico del genoma objeto de estudio. Welsh y McClelland (1990) y Williams *et al.* (1990) desarrollaron este método de forma independiente y simultánea y se ha denominado RAPDs. El patrón de bandas resultante de la amplificación genómica es altamente reproducible y puede ser utilizado como “huella dactilar” para: i) identificación de variedades y determinación de parentescos (Welsh *et al.*, 1991a); ii) mapeo genético, ya que responde a una genética mendeliana (Williams *et al.*, 1990 y Welsh *et al.*, 1991b) y iii) para generar árboles filogenéticos, especialmente a nivel intraespecífico (Welsh *et al.*, 1991a, b).

La técnica de PCR-RAPDs ha sido empleada muy eficazmente para calcular el grado de variación genética en un rango muy amplio de organismos, tales como primates, ungulados, *Drosophila* (Espinasa y Borowsky, 1998), saltamontes (Chapco *et al.*, 1992), hongos (Wyss y Bonfante, 1996; Junghans *et al.*, 1998) y bacterias (Young y Cheng, 1998). En contraste a otras técnicas en las que se amplifican fragmentos de ADN de los que se conoce tanto su secuencia como su función fisiológica, con la técnica de PCR-RAPDs se amplifican fragmentos de los que se desconocen su papel fisiológico. El mayor número de bandas que se obtiene y la necesidad de utilizar varios “primer”, hacen de esta técnica una herramienta muy potente en estudios de variabilidad genética. Además, la gran cantidad de muestras que pueden analizarse de forma rápida y económica debido a las cantidades que se utilizan, dan un gran ventaja a esta técnica sobre otras (Young y Cheng, 1998).

Existen estudios sobre la fiabilidad del método RAPDs-PCR (Meunier y Grimont, 1993). Uno de los aspectos en los que más se ha incidido es en la reproducibilidad del método. Este problema ha sido estudiado en profundidad por McClelland y Welsh (1994). La variabilidad intraexperimental puede centrarse fundamentalmente en la inadecuada purificación del ADN. La resolución de este problema pasa por comprobar la repetitividad de los resultados sobre una serie de diluciones de ADN (McClelland y Welsh, 1994). Por esta razón, es conveniente comprobar su grado de purificación tras el aislamiento, por lo que se amplificó sistemáticamente el ADN de cada cepa en dos diluciones con uno de los “primers” empleados. El método de aislamiento y purificación de ADN empleado por nosotros se ha mostrado muy eficaz dada la repetitividad que se obtenía al realizar los controles anteriormente mencionados. Según los autores citados, las variaciones encontradas entre días y laboratorios se deben a variaciones en las características de los tampones, calidad de los enzimas y preparación de los “primers”.

El empleo de varios “primers” a la hora de calcular la divergencia genética según los patrones de bandas obtenidos, es uno de los factores señalados por Clark y Lanigan (1993) como decisivos. Si en la secuencia que reconoce el “primer” (10 nucleótidos) el número de sustituciones es mayor que uno, la técnica lo reconocería como una sola sustitución. Por este motivo, resulta absolutamente imprescindible el empleo de varios “primers” que nos permitan un cálculo de divergencia independiente, para posteriormente integrar dicha información.

Esta metodología se utiliza en estudios de microecología resolviendo una serie de problemas que han hecho muy difícil el progreso de esta disciplina. Mediante esta técnica se puede identificar con un alto nivel de exactitud las cepas que colonizan la rizosfera (Sellstedt *et al.*, 1992), de forma que se hacen posibles los estudios comparativos de la composición rizobacteriana entre especies vegetales. Por otra parte, permite abordar estudios de colonización debido a que las cepas inoculadas se pueden identificar con exactitud entre la comunidad rizobacteriana natural, evitando el empleo de metodologías con graves limitaciones, como el uso de mutantes para identificar cepas concretas (Oullet y Seifert, 1993).

Con los géneros bacterianos mayoritarios encontrados en cada parcela de cada especie y en los dos momentos de muestreo, se procedió tal y como se describe en el Apartado 5.5. Una vez obtenidos los dendrogramas que integran la información de los

tres “primers” se agruparon las cepas entre sí cuando la similitud entre ellas fue mayor o igual al 90 %.

Aunque diferencias de un 10 % en la divergencia genética podrían hacer pensar en capacidades metabólicas diferentes como producción de hormonas, resistencia y producción de antibióticos, etc., hemos establecido esta barrera ya que a pesar de que los géneros analizados, excepto *Bacillus*, tiene divergencias en el porcentaje de G+C menores del 10 %, esta técnica no es comparable al análisis de homologías de ADN mediante las técnicas anteriormente mencionadas, ya que su poder de discriminación es menor (Fig. 8.2). Sin embargo, es un punto de referencia válido ante la falta de datos concretos. A continuación, se expondrán las variaciones en los porcentajes de G+C de los géneros mayoritarios que hemos encontrado en la rizosfera de las especies estudiadas, pero antes conviene señalar que los criterios para delimitar especies procariotas, se establece por consenso del comité internacional de sistemática bacteriana. Dicho comité estableció que divergencias en torno a un 30 % (medidas mediante la técnica de hibridación de ADN) son suficientes para definir una especie bacteriana (Wayne *et al.*, 1987), mientras que divergencias en torno al 40-45 % discriminan géneros bacterianos. Es interesante hacer notar que la homología del ADN cae dentro de un rango de similaridad semejante al utilizado para definir géneros y especies a través de pruebas bioquímicas clásicas.

El género *Bacillus* alcanza diferencias interespecíficas de más de un 30 % en la cantidad total de G+C (Claus y Berkeley, 1986). El porcentaje de G+C más bajo, dentro de las especies del género *Bacillus* que aparecen en el suelo, se ha descrito en *B. cereus* (31,7 mol % G+C) (McDonald *et al.*, 1963) y el más alto es de un 61 mol % de G+C para *B. circulans* (Claus y Berkeley, 1986). Como ejemplo a nivel intraespecífico podemos citar el hecho de que en un estudio realizado entre 123 cepas pertenecientes a *B. circulans* se han encontrado variaciones de hasta un 24 mol % G+C (Nakamura y Swezey, 1983), y en un estudio realizado sobre 120 cepas de *B. mycoides*, mediante la técnica RFLPs, Bell y Friedman (1994) detectan divergencias genéticas de hasta un 50 %, empleando el algoritmo de Nei y Miller (1990).

Las diferencias interespecíficas encontradas en los otros géneros mayoritarios analizados son de un 11 % en *Arthrobacter* (Conn y Dimmirk, 1947), un 2,5 % en

*Aureobacterium* (Collins *et al.*, 1983), un 5% en *Cellulomonas* (Bergey *et al.*, 1923) y un 12 % en *Pseudomonas* (Bergey's Manual, 1986)

Dado que la técnica PCR-RAPDs se ha mostrado como una metodología con un alto poder de resolución para detectar polimorfismos, y teniendo en cuenta los únicos datos disponibles sobre la variabilidad de los géneros mencionados, el criterio elegido para el establecimiento de grupos (cepas con una divergencia menor del 10 %), nos permite asumir que las actividades metabólicas de deben ser escasas. Esta es la razón por la cual se selecciona una cepa al azar de cada grupo, con la cual se realizan las pruebas biológicas que se discuten posteriormente.

El género *Bacillus* sólo fue mayoritario en la rizosfera de *L.luteus*, teniendo en cuenta las tres poblaciones y los dos momentos de muestreo. Se analizan 14 cepas mediante PCR-RAPDs, formándose 6 grupos con un índice de similitud mayor o igual al 90 % (Fig. 6.43). Es interesante señalar que si consideramos una divergencia menor o igual al 15 %, se forman 3 grupos, con una divergencia superior al 25 % se forman sólo dos grupos, lo que previsiblemente indica la existencia de un máximo de 2 especies entre los *Bacillus* encontrados. Una de ellas es claramente mayoritaria y podemos encontrarla en las 3 poblaciones y en los 2 momentos de muestreo estudiados. Lo mismo podemos indicar a nivel de cepa, la cepa que constituyó el grupo 3 aparece en las 3 poblaciones y en los 2 momentos de muestreo.

El género *Arthrobacter* sólo fue mayoritario en *L.albus* T2 en las poblaciones 2 y 3. Con las 11 cepas analizadas se formaron 2 grupos (Fig. 6.41), entre los que se estableció una diferencia muy clara entre las cepas recogidas en la parcela 2 y las recogidas en la parcela 3, separándose entre sí al nivel del 75 % de similitud, lo que de nuevo está indicando una escasa variabilidad debido a la probable existencia de sólo 2 especies diferentes.

El género *Aureobacterium* fue mayoritario en alguna de las poblaciones y momentos de muestreo de las cuatro especies estudiadas. El caso más llamativo es el de *L.angustifolius* en el que *Aureobacterium* fue mayoritario en todas las poblaciones y momentos de muestreo. Como resultado de esto, el número de cepas analizadas (73) fue el mayor de todos los géneros mayoritarios. En el dendrograma se formaron 11 grupos con una divergencia menor o igual al 10 % (Fig. 6.39). Es destacable el hecho de que dentro de un mismo grupo encontramos la misma cepa recogida en las cuatro especies de

*Lupinus*. Por ejemplo, en el grupo 10, nos encontramos cepas recogidas en tres de las cuatro especies estudiadas, en los dos momentos de muestreo, con similitudes del orden del 98 %. En el grupo 7 encontramos cepas recogidas de las cuatro especies de altramuz con similitudes de entre el 91 y el 98 %, en el grupo 10 incluso encontramos una similitud del 100 % entre una cepa recogida en *L.angustifolius* y una cepa recogida en *L.hispanicus*.

El género *Cellulomonas* fue sólo mayoritario en *L.hispanicus* y en *L.albus*. Con las 19 cepas analizadas se formaron 4 grupos (Fig. 6.40). En este caso, la homogeneidad de los grupos fue muy evidente, la mayoría de las cepas de *L.albus* se disponen en el grupo 4 con un 100 % de similitud. Las cepas de *L.hispanicus* T1 de la población 1 se agrupan en el grupo 1. En los otros dos grupos aparecen cepas de *L.hispanicus* y *L.albus*, pero siempre pertenecientes a la misma población y momento de muestreo en cada caso.

El género *Pseudomonas* sólo fue mayoritario en *L.hispanicus* T2 en la parcela 1. Con las 4 cepas analizadas se formaron 2 grupos con 3 y 1 cepas, respectivamente (Fig. 6.42). Hay que destacar que el grupo formado por las tres cepas, 2 de ellas tenían un índice de similitud del 100 % y éstas a su vez eran un 98,5 % similares a la tercera.

Nuestros resultados indican una especificidad en la interacción bacteria-planta. Este hecho debe ser analizado desde la perspectiva de la variabilidad genética encontrada en el sistema rizosférico. El hecho de que en el género cuantitativamente mejor representado, *Aureobacterium*, aparezcan cepas con un nivel de divergencia extraordinariamente bajo en especies, poblaciones y momentos de muestreo diferentes, debe ser interpretado como el resultado de una compatibilidad metabólica entre la bacteria y la planta, debida a determinados patrones de exudación, los que a su vez vienen determinados genéticamente (Hedges y Messens, 1990; Bolton *et al.*, 1993).

Coexistiendo con cepas altamente específicas, resultado de una selección en la que la planta desempeña un papel fundamental, aparecen cepas características de una especie, población o momento de muestreo. Desde nuestro punto de vista, la disminución de diversidad va asociada a una presión selectiva impuesta por la planta, de forma que el hecho de que aparezcan genomas iguales en la rizosfera de distintas especies pertenecientes al mismo género, implica algún tipo de especificidad entre la planta y las bacterias, probablemente adaptativa y resultado de la coexistencia natural de

plantas y bacterias (Chanway *et al.*, 1988a; 1988b; Sumner, 1990), y de la compatibilidad metabólica entre planta y bacteria, que es independiente de la coexistencia de estos organismos (Chanway *et al.*, 1989).

No obstante, la especificidad, previsiblemente, debe ser el resultado del beneficio mutuo, directo o indirecto, de la mencionada coexistencia, por lo que el análisis del posible efecto beneficioso sobre la fisiología de la planta de las bacterias presentes en la rizosfera, debe ser el siguiente paso en el estudio de la interacción. El hecho ya demostrado por nuestro equipo, de la presencia de bacterias en el sistema rizosférico capaces de estimular el crecimiento de la planta, o de prevenir la colonización de patógenos (Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996) es un indicio de lo anteriormente mencionado. De forma que apoyándonos en los datos de divergencia genética y en los análisis de las capacidades metabólicas de las bacterias y su efecto sobre la fisiología de las plantas, podemos deducir que la especificidad propuesta por Chanway y Nelson (1991) y Chanway *et al.* (1989) debe ser asumida como algo demostrado a través de las dos vías mencionadas.