



ugr

Universidad
de Granada



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



eez
Estación Experimental del Zaidín

Universidad de Granada

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

Estudio de la diversidad procariótica y caracterización taxonómica y funcional de las bacterias asociadas a la raíz de roble melojo (*Quercus pyrenaica* Willd.) y de leguminosas forrajeras del Espacio Natural de Sierra Nevada

Ana Vicente Lasa

TESIS DOCTORAL

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Vicente Lasa
ISBN: 978-84-1306-346-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/57688>

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Investigación de Ecología Genética de la Rizosfera, perteneciente al Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC).

Para la realización de este trabajo, la doctoranda Ana Vicente Lasa ha contado con las siguientes **fuentes de financiación**:

- “Investigaciones sobre la flora forrajera natural en mejoras de pastos, restauración forestal, y silvicultura preventiva con ganado: una experiencia piloto en Sierra Nevada”. Proyecto del Organismo Autónomo Parques Nacionales; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente con referencia OAPN 748/2012; realizado desde diciembre 2012 hasta diciembre 2016.
- “Adaptación y mejora de la resiliencia del monte mediterráneo frente al cambio climático y los incendios forestales mediante el manejo de microorganismos rizosféricos”. Proyecto del programa RECUPERA 2020 con referencia 20134R069 financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y CSIC; realizado desde diciembre 2013 hasta diciembre 2015.
- “Estrategias basadas en aproximaciones ‘-ómicas’ para el manejo de la Verticilosis del olivo: Genómica comparada de patotipos y cambios inducidos en el microbioma de la raíz”. Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad con referencia AGL2016-75729-C2-1-R; realizado desde diciembre 2016 hasta diciembre 2019.
- Contrato asociado al proyecto: “Adaptación y mejora de la resiliencia del monte mediterráneo frente al cambio climático y los incendios forestales mediante el manejo de microorganismos rizosféricos con referencia 20134R069, Programa RECUPERA 2020 (2014-2015).
- Ayuda para contrato predoctoral para la Formación del Profesorado Universitario (FPU, ref. FPU014/03420), concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2015-2019).
- Ayuda para la realización de estancias breves asociada al contrato FPU (ref. EST16/00202), en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Microbiología de la Academia Checa de Ciencias (Praga, República Checa), y bajo la supervisión del Dr. D. Petr Baldrian (septiembre 2017-diciembre 2017).

Parte de los resultados presentados en esta memoria de Tesis Doctoral han sido ya **publicados** o están **en preparación**:

- Villadas, P.J*, **Lasa A.V***, Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J.D., Martínez-Molina, E., Toro, N. y Velázquez E., Fernández-López, M. (2017) Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). Systematic and Applied Microbiology;10:92-101. * *Misma contribución*

- **Lasa, A.V.**, Fernández-González A.J., Villadas P., Toro N. y Fernández-López, M. (2019) Metabarcoding reveals that rhizospheric microbiota of *Quercus pyrenaica* is composed by a relatively small number of bacterial taxa highly abundant. *Scientific Reports*;9:1695.
- **Lasa, A.V.**, Mašínová, T., Baldrian, P. y Fernández-López, M. (2019) Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. *PLoS ONE*;14:e0214422.
- Robles Cruz, A.B., Ramos Font, M.E., Tognetti Barbieri, M., Fernández López, M., Sandalio González, L.M., Villadas Latorre, P., **Lasa, A.V.**, Reine Viñales, R.J. y González Rebollar, J.L. Investigaciones sobre la flora forrajera natural en mejoras de pastos, restauración forestal, y silvicultura preventiva con ganado: Una experiencia piloto en Sierra Nevada. (*Sometido*, Organismo Autónomo de Parques Nacionales)
- **Lasa, A.V.**, Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A. y Fernández-López, M. Genotypic, taxonomic and functional diversity of *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of *Quercus pyrenaica* trees. (*En preparación*).

Adicionalmente, durante el periodo de Tesis Doctoral la doctoranda ha colaborado en las siguientes **publicaciones** y **congresos**:

- **Vicente Lasa, A.**, González Pellicer, A., Fornes Sebastià, F., Belda Navarro, R.M. y Cuesta Amat, G. (2014) Enzymatic activities and antagonisms against phytopathogenic fungi of actinomycetes isolated from environmental samples. En: Méndez-Vilas, A. (ed.) *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends*. Países Bajos: Wageningen Academic Publishers.
- Fernández-González, A.J., **Lasa, A.V.**, Fernández-López, M. (2018) Whole-Genome Sequences of Two *Arthrobacter* Strains Isolated from a Holm Oak Rhizosphere Affected by Wildfire. *Genome Announcements*;6:e00071-18.
- Fernández-González, A.J., Wentzien, N.M., Villadas, P.J., **Lasa, A.V.**, Gómez-Lama Cabanás, C., Mercado-Blanco, J. y Fernández-López, M. Comparative study of neighboring tree-associated belowground microbial communities subjected to different soil management. *Applied Soil Ecology* (*En revisión*).
- **Lasa, A.V.**, Villadas, P.J., Fernández-González, A.J., Fernández-López, M. Microorganismos del suelo para la recuperación de robledales. Póster de las I Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI). Granada, 18-20/05/2016.
- **Lasa, A.V.**, Villadas, P.J., Robles, A.B., Toro, N., Fernández-López, M. Análisis de los endosimbiontes de plantas leguminosas de los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* empleados para el mantenimiento de los cortafuegos en el Parque

Nacional de Sierra Nevada. Póster de las II Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI). Granada, 17-19/05/2017.

- **Lasa, A.V.**, Fernández-González, A.J., Villadas, P.J., Toro, N., Fernández-López, M. Total and potentially active rhizospheric microbiomes of melojo oak. Póster del 7º Congreso de Microbiólogos Europeos (FEMS). Valencia, 09-13/07/2017.
- **Lasa, A.V.**, Villadas, P., Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J.D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., Fernández-López, M. Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). Póster del 20º Congreso Internacional de Fijación de Nitrógeno (FEMS). Granada, 03-07/09/2017.
- **Lasa, A.V.**, Fernández-González, A.J., Villadas, P.J., Toro, N., Fernández-López, M. The *Quercus pyrenaica* rhizospheric microbiome. Póster de la reunión correspondiente a la Acción COST FP1305 “Soil biodiversity and European woody agroecosystems”. Granada, 14-16/03/2018.
- Villadas, P.J., **Lasa, A.V.**, Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J.D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., Fernández-López, M. Analysis of rhizobial endosymbionts of legumes species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). Póster de la reunión correspondiente a la Acción COST FP1305 “Soil biodiversity and European woody agroecosystems”. Granada, 14-16/03/2018.
- **Lasa, A.V.**, Mašínová, T., Baldrian, P., Fernández-López, M. Ponencia en las/el III Jornadas/I Congreso Nacional de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI). Granada, 20-22/06/2018.

*A mis padres
A mi hermano mayor
Nire anai ertainari*

A Gonzalo



AGRADECIMIENTOS

La imagen muestra una bellota de *Quercus pyrenaica*.

Fuente: Ana V. Lasa.

A pesar de que los convencionalismos no van conmigo, demasiadas vivencias se han acumulado estos últimos años, las cuales finalmente me han empujado a escribir estas líneas que siempre dije que nunca escribiría. Además, dicen que agradecer habla bien del corazón y hace que el corazón hable.

En primer lugar quisiera mostrar mi agradecimiento a los siete (5+2) miembros del Tribunal y a los dos expertos internacionales por aceptar nuestra propuesta de evaluar esta Tesis Doctoral.

Debo agradecer a mi director de Tesis el haberme abierto las puertas del laboratorio en mi inocente llegada a Granada, y la confianza depositada en mí desde aquel momento. Pero sobre todo, gracias Manolo por el lado humano y el apoyo recibido cuando la situación personal se ha puesto hostil.

Gracias también a todos mis compañeros de grupo, a Pablo, Fernando, por los ratos de charla y las risas; a Chema por compartir conmigo buenos ratos; a Lola y Rafa por muchas cosas, por los consejos recibidos, y especialmente por estar ahí en los momentos que de verdad importan y que exceden la ciencia. A Paco por ponerle un poco de sur a este cachito del norte; a Tita por su optimismo y al igual que Paco, por los ánimos diarios durante los aplastantes días de escritura; a JI, como no, por darle la chispa de la vida a todo este tiempo, por ser un tío serio y darle cordura a todo este desbarajuste, y sobre todo por los saludos en un perfectísimo euskara que pocos manejan con semejante soltura. Especial gratitud siento hacia Marta Robledo, tanto por su cariño como por ser una estupenda referente científica. Por supuesto gracias a mi Sensi por los momentos de tertulia, por escucharme, y sobre todo por hablarme siempre con sinceridad; gracias en definitiva por ser una de las personas clave que me ha empujado en los momentos de estancamiento. Imposible olvidarme de Pepe; gracias por seguir siendo mi compañero pese a la distancia, por asesorarme, por tus consejos científicos y no científicos y por acordarte de nosotros tres siempre. Debo también expresar gratitud hacia Hurry, mi hermano científico y constituyente del *team triplicate* o *team pachangomics*. Es difícil sintetizar todos los motivos por los que debo decirle gracias: por todo lo que me has enseñado que ha sido siempre de gran valía, por escuchar mis inquietudes, mis quejas y mis preocupaciones en los momentos más difíciles. Por las incontables horas de risas y buen humor. Pero especialmente gracias por acompañarme en mis sueños científicos y por ser mi amigo también fuera del laboratorio.

En la misma línea quiero agradecer a Natalia, Álex, Mario, Pedro, etc., y especialmente a mis chicos estrella Sergio y Vicente porque ¡no puedo citar un momento de todo este periodo que no me hayáis hecho sentir a gusto! Gracias por los ratos de conversación por la segunda planta, las bromas y el buen sentido del humor, las visitillas al laboratorio 204 o laboratorio de *la bellota dorada*, y porque me he reído con vosotros muchísimo! Gracias por los cafés, las tapas, las incursiones nocturnas, la montaña y todos esos ratos que han hecho que la tesis haya sido liviana. Gracias por estar siempre ahí al pie del cañón.

Quisiera también agradecer al equipo MJP al completo por las enseñanzas recibidas sobre el trabajo con hongos y por el cariño recibido en mis incursiones a sus

concurridos laboratorios. Gracias a Juan y a la líder del grupo porque todos tuvisteis paciencia y palabras de alivio para mí dos de los días de mayor desconuelo científico y agobio de esta andanza doctoral. Gracias por hacerme sentir como en casa. Entre ellos y además de ellos tengo que agradecer a Judith, Leyre (Leire!), Laura, Lidoy, Javi, Gabriela, Jorge, Pablo, etc., y con especial cariño a Tamara, Carmen y Ceci por tantos buenos ratos compartidos durante el último tiempo; tanto en la EEZ con cafés, comidas y conversaciones divertidas, como fuera del centro, con aventuras de diverso tipo. ¡Qué bien me lo he pasado con vosotros!

Por otro lado, quisiera también expresar mi gratitud hacia Pepe Palma por los años de tutoría y asesoramiento, y también a Carmelo por los últimos meses de colaboración, siempre llevada a cabo con una amable sonrisa.

Gracias a la gente del *Servicio de Evaluación, Recuperación y Protección de Agrosistemas Mediterráneos* (Pastos) por las enseñanzas y la amabilidad recibida en nuestras colaboraciones, ha sido un gusto trabajar con vosotros. Igualmente al equipo salmantino, concretamente a Encarna Velázquez y Álvaro Peix por su predisposición.

Debo agradecer al innumerable personal no científico de la EEZ que siempre me ha dedicado una sonrisa, unas palabras como iguales que somos, y más de una risa que otra. Gracias por no considerar una bata blanca como un muro de separación en el trato personal.

Quiero agradecer a Víctor. Por apoyarme siempre que ha sido necesario, y por admirarme en secreto. Y si no es así, por habérmelo hecho creer.

Agradecimientos sinceros a Don Manuel Gracia Rivas del Centro de Estudios Borjanos, su pupilo y colaboradores por el apoyo veraniego recibido y por hacer de los últimos días de tesis un periodo liviano y agradable.

No debo ni quiero olvidarme del equipo checo. Gracias a Petr en especial, por asesorarme, corregirme, por enseñarme tantísimas cosas sobre el bosque y su ecología, pero sobre todo por integrarme en el equipo, considerarme un miembro más del mismo y por las palabras amables que siempre he recibido. Le agradezco a todo el grupo la hospitalidad, el trato y las enseñanzas recibidas, especialmente a Mirka, Petra, Diana, Vojtěch y al *café latino team* compuesto por Tijana, Daniel Kumazawa, Judith y Rubén por acogerme como lo hicisteis. Gracias a Elena Fiorentini por ser mi confidente y por las horas de conversación en tierras lejanas. ¡Muchísimas gracias a todos por haberme hecho pasar unos de los mejores meses de mi experiencia científica!

Llegó el momento en el que tengo que hacer uso de la mordacidad y acidez que tanto adoro, para ser sutil y agradecer de todo corazón a quienes de verdad más me han ayudado a crecer como investigadora, pero sobre todo como persona. Gracias pues a todos aquellos que me pusisteis (inconscientemente) una zancadilla, o que me pusisteis las cosas difíciles. A los que no creyeron en mí. A los que dudasteis de mi trabajo o lo cuestionasteis. A los que nunca supisteis (o no quisisteis) reconocer mi esfuerzo, fuera éste útil o no. A los que no consideran los estudios descriptivos como ciencia. A quien no supo nunca decirme que estaba equivocada en los momentos en los que erré o iba desencaminada. Ni qué decir de aquellos quienes tampoco supieron pasarme la mano por el hombro cuando las cosas iban bien. A quien dijo que no sabíamos hacer

ciencia, pero nunca me dejó claro cómo realmente había que hacerla. A los fatuos. A los ignorantes. A los despreocupados. Sinceramente os doy las gracias. Porque me habéis enseñado a cultivar la paciencia, habéis logrado que me haya contenido en los momentos en los que mi genio llegaba al límite de la condescendencia. Gracias porque ciertos comentarios me han enseñado a convertir las dificultades en retos y desafíos y perseguir con más coraje y rabia lo propuesto. Gracias porque todo ello a contribuido a valorar más mi trabajo, creer en mis cualidades por mínimas que sean y demostrarme que uno puede crecerse en las dificultades siendo persistente y tenaz pero nunca contumaz. En definitiva, gracias por contribuir a mi desarrollo personal.

No puedo terminar de expresar mi gratitud sin hacer referencia al inicio de todo. Gracias a Gonzalo. Gracias por ser mi maestro, por sembrar la semilla de mi andadura científica. Por enseñarme con experiencias tan duras como las que vivimos que la vida con esperanza y optimismo se lleva mucho mejor. Gracias por la enorme cantidad de cosas que me enseñaste, desgraciadamente, en tan corto tiempo. Desde los conocimientos hasta lo más personal; gracias por demostrarme tu bondad, tu grandeza, tu buen humor, tu amor por la ciencia y sobre todo ese gran corazón que te invadía. Gracias por todas las oportunidades brindadas, por cree en mí, por el reconocimiento a mi esfuerzo y en especial por luchar tan intensamente hasta el último segundo de tu arrebatada vida. En definitiva, gracias por ser mi GUÍA, y por haberme dejado antes de irte el modelo de lo quiero ser en mi vida. **GRACIAS GON.**

Gracias a Miguel por su cabeza loca y por estar – ocultamente – orgulloso de mí. Por el entusiasmo sentido por mis éxitos y mis pequeños logros. Por sentir fascinación por el lugar al que he llegado, y por pensar y tener más ideas que yo sobre mi futuro. Por ser único ¡Gracias fenómeno!

*Orain nire anai maitia eskertu behar dut, nire kamarada! Bakoitzak norbere ibilbidea egin arrez, kontinente ezberdinetan ibili eta, **BETI** nire alboan sentitu zaitut. Mila esker nire kexak entzutea ta ulertzeagatik, ta nire ondoan beti egoteagatik. Eskerri asko zure kezkatik. Mila esker ni zaintzeagatik.*

Gracias a mis únicos dos fieles compañeros que me han acompañado en cada paso que he dado, doy y daré en esta vida. A mi Paco y mi amatxo, por estar SIEMPRE ahí incondicionalmente, soportando el chaparrón. Es corta la extensión de esta Tesis en comparación con las hojas de agradecimientos que podría y debería escribir, pero lo resumiré diciendo que gracias por dar vuestra vida por la mía. Yo haré lo mismo con la mía propia.

*“Nos pidieron por mercet que les otorgassemos que nos nin otro por
nos pongamos fferreinos en Alava porque los montes non se yermen
nin se astinguen”*

[Alfonso XI en el documento de la Voluntaria Entrega de la Tierra de Álava a la Corona de Castilla (Pacto de Arriaga, año **1332**), poniendo de manifiesto la preocupación por la presión ejercida sobre los robledales y otros bosques a causa de la explotación para la obtención de materia prima para las ferrerías]



RESUMEN / SUMMARY

La imagen muestra el paisaje en el Espacio Natural de Sierra Nevada.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

RESUMEN

Los servicios ecosistémicos asociados a los bosques son incuestionables, contribuyendo en gran medida tanto al bienestar social (proporcionando importantes productos de mercado), como a la regulación de numerosos procesos ecológicos (bienes intangibles) (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Pese a su importancia a escala global, los biomas forestales se encuentran fuertemente amenazados por el cambio climático y los cambios en la gestión y uso del suelo. Así, el Espacio Natural de Sierra Nevada, en el sureste de la Península Ibérica, es un enclave en el que las previsiones sobre el incremento de las temperaturas, el descenso de las precipitaciones anuales, y el aumento de la frecuencia e intensidad de los incendios forestales, resultan especialmente preocupantes (Pausas, 2004; Zamora *et al.*, 2015). Una de las especies leñosas sobre la cual es notorio el impacto del cambio climático y del cambio de gestión de sus masas, es *Quercus pyrenaica* Willd. (roble melojo). Sus bosques se encuentran en la actualidad considerablemente degradados y fragmentados, siendo igualmente alarmante su escaso vigor vegetativo (Nieto Quintano *et al.*, 2016). Así pues, urge el desarrollo de estrategias silvícolas que permitan mejorar el estado de debilitamiento de los melojares nevadenses. En este contexto, es conocido el importante papel que las bacterias desempeñan en los ecosistemas forestales, participando en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y contribuyendo al mejor estado general de salud de las plantas mediante diversos mecanismos, como la mejora de la biodisponibilidad de ciertos nutrientes y la protección de sus hospedadores frente a organismos fitopatógenos (Glick, 2012; Lladó *et al.*, 2017).

En este trabajo se han caracterizado – a nivel genotípico, taxonómico, funcional o enzimático, según el caso – las bacterias asociadas a la raíz de plantas leguminosas silvestres y de roble melojo, al objeto de poder llevar a cabo en un futuro tareas de prevención de incendios y de mejora de las masas boscosas del Espacio Natural de Sierra Nevada.

En primer lugar, se caracterizaron las bacterias aisladas del interior de los nódulos de las leguminosas *Lathyrus cicera*, *L. intricatus*, *Vicia sativa* subsp. *angustifolia*, *V. disperma*, *Trifolium glomeratum* y *T. cherleri*, al objeto de poder mejorar la calidad de dichas especies que forman parte de la flora forrajera naturalmente presente en Sierra Nevada. El genotipado de 205 aislados reveló la gran diversidad genotípica de mismos. A su vez, el análisis taxonómico basado en varios genes cromosómicos permitió clasificar las cepas en estudio en el grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum*. Sin embargo, ninguna de ellas pudo ser identificada a nivel de especie: si bien algunas cepas podrían considerarse como candidatas a nuevas especies, en otros casos el diverso origen filogenético de las mismas según el gen cromosómico en estudio hizo imposible su identificación. Por el contrario, el análisis del gen de nodulación *nodC* demostró que las cepas aisladas de *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. pertenecen al simbiovar *viciae*, mientras que aquellas obtenidas de los nódulos de *Trifolium* correspondieron al simbiovar *trifolii*. Dichos resultados han sido ya publicados (Villadas *et al.*, 2017) y se recogen en el Capítulo I de la presente memoria de Tesis.

De forma previa al desarrollo de bioinoculantes a aplicar sobre un hospedador vegetal concreto, resulta esencial conocer en detalle la comunidad procariota asociada al mismo (Kaminsky *et al.*, 2019). La pirosecuenciación de amplicones correspondientes

al gen *rrs* así como del ds-cDNA derivado de sus transcritos permitió llevar a cabo un estudio detallado sobre la composición y estructura de las comunidades procariotas totales y potencialmente activas, respectivamente, que habitan la rizosfera de roble melojo. Los resultados obtenidos revelaron que el *core* procarioma total y potencialmente activo se encuentra definido por un número relativamente bajo de OTUs que dominan la rizosfera de roble melojo. Mediante la comparación de ambos tipos de poblaciones fue posible además determinar que ciertos OTUs pertenecientes a los géneros *Phenylobacterium* y *Pseudomonas*, entre otros, podrían encontrarse sintetizando activamente ribosomas aun encontrándose en baja abundancia en el suelo rizosférico. Así, los resultados incluidos en el Capítulo II y publicados recientemente (Lasa *et al.*, 2019a) sugieren que los mencionados OTUs podrían ser influyentes en el hábitat en estudio.

Una vez conocida la composición del procarioma rizosférico, se realizaron diferentes análisis (mediante secuenciación masiva con Illumina) con los que se pretendió conocer si las comunidades procariotas de la rizosfera de robles inoculados y no inoculados en vivero con un consorcio bacteriano, previamente obtenido por el grupo de investigación, son diferentes tras año y medio de su trasplante a campo. La comparación de los índices diversidad α , estructura, perfiles taxonómicos y de las posibles funciones desempeñadas por los miembros de ambas comunidades procariotas permitió confirmar que no existen diferencias entre las poblaciones de robles inoculados y control, a ninguno de los niveles estudiados (Capítulo III).

Dado que la inoculación bacteriana aparentemente no resultó en una alteración de las comunidades procariotas, se procedió a la búsqueda en el entorno radicular de roble melojo de posibles candidatos bacterianos a bioinoculantes, en base a los resultados obtenidos en el Capítulo II. Inicialmente, a partir de la rizosfera de roble melojo se aislaron 44 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* genotípicamente diversas, de las cuales algunas podrían pertenecer a la especie *P. lactis* y otras a hasta cinco nuevas especies. Por otro lado, de la endosfera radicular se aislaron 17 cepas cuya identificación taxonómica reveló que todas pertenecían al género *Luteibacter*, y con alta probabilidad a la especie *L. rhizovicinus* (Capítulo IV).

Finalmente, se procedió a la caracterización funcional de las 61 cepas aisladas del entorno radicular de roble melojo, para lo cual se estudió en primera instancia el potencial rol de las mismas en la descomposición de la materia orgánica. Mediante la realización de ensayos fluorimétricos se estudió la actividad de 12 enzimas hidrolíticos extracelulares, analizando la actividad de los mismos en asociación a la pared celular bacteriana, y cuando estos son excretados al medio extracelular. Así, en el caso de las cepas pertenecientes al género *Luteibacter* pudo apreciarse que gran parte de la actividad total de la mayoría de los enzimas se atribuye a la fracción celular, siendo la estrategia de utilización de enzimas de las cepas del género *Pseudomonas* variable y dependiente del enzima considerado. Teniendo en cuenta la actividad detectada en ambas fracciones, fue posible determinar que las cepas pertenecientes al género *Luteibacter* son capaces de producir un amplio rango de polisacaridas (celulasas, diversos tipos de hemicelulasas y quitinasa), así como fosfata ácida y lipasa. En el caso de las cepas adscritas al género *Pseudomonas*, la producción y actividad de los enzimas hidrolíticos estudiados resultó más modesta, siendo 15 el número promedio de enzimas producidos. Nuevamente, la lipasa y la fosfatasa ácida fueron los enzimas producidos

por mayor número de cepas del género *Pseudomonas* y aquellos para los que se detectó un mayor nivel de actividad. Así, los resultados de los ensayos enzimáticos (correspondientes al Capítulo V y ya publicados, Lasa *et al.*, 2019b) demostraron que las bacterias analizadas aisladas de la rizosfera y endosfera radicular de roble melojo podrían contribuir, en diferente medida, a la degradación de la materia orgánica. Ello a su vez implica que podrían participar activamente en los ciclos del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P), procesos clave en los ecosistemas forestales (Lladó *et al.*, 2017).

La caracterización funcional culminó con la evaluación *in vitro* de varias propiedades asociadas a la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal. Así, el potencial efecto beneficioso de las bacterias en estudio sobre el desarrollo vegetal quedó reflejado en la capacidad de 18, 22, 31, 38, 39 y 40 cepas del género *Pseudomonas* de producir proteasas, compuestos indólicos, solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, producir endocelulasas, solubilizar CaHPO_4 y sintetizar sideróforos. A su vez, todas fueron capaces de expresar catalasa y tolerar ácido tánico, siendo dos de ellas capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan a quercíneas (*Biscogniauxia mediterranea*, *Diplodia corticola*, *Armillaria mellea*). Asimismo, todas las cepas del género *Luteibacter* mostraron habilidad de producir sideróforos, catalasa, compuestos indólicos, endocelulasas y dos de ellas de sintetizar proteasas. En última instancia el efecto promotor del crecimiento vegetal fue demostrado mediante ensayos *in planta* sobre *Medicago sativa* (alfalfa) para 12 de las cepas en estudio, si bien este no pudo ser observado sobre quercíneas, ni tan siquiera sobre plántulas de *Q. pyrenaica* (Capítulo VI).

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en este trabajo, es posible concluir que el Espacio Natural de Sierra Nevada – y en concreto el nicho radicular de plantas leguminosas forrajeras y de la leñosa *Q. pyrenaica* – constituye un excelente reservorio de diversidad bacteriana a diferentes niveles. En dicho hábitat es posible encontrar bacterias con potencial promotor del crecimiento vegetal (directo e indirecto), y con un posible marcado papel en el ciclo de ciertos elementos como el C, P y N. La utilización como bioinoculantes de plantones de roble melojo con los que llevar a cabo tareas de repoblación se presenta como una herramienta de bajo impacto ecológico y prometedora en el ámbito de la silvicultura integrada, siendo aún necesario profundizar en ciertos aspectos en el futuro.

SUMMARY

The ecosystem services associated with forests are very valuable, since they contribute to society's welfare to a great extent (for example, by providing important market products), and especially to the regulation of numerous ecological processes (intangible goods) (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). In spite of their worldwide significance, forest biomes are strongly threatened by climate change and land use and management changes. Therefore, the predicted rise in temperatures, decrease in annual rainfall levels and the consequent increase in the frequency and intensity of forest fires, are especially worrying in the Natural Space of Sierra Nevada, in the southeast of the Iberian Peninsula (Pausas, 2004; Zamora *et al.*, 2015). *Quercus pyrenaica* Willd. (also known as melojo oak) is one of the woody species which is markedly affected by the change in the management of its forests and by climate change. Its forests show an advanced state of deterioration and fragmentation, thus the vegetative vigour of this species is currently considered extremely worrying (Nieto Quintano *et al.*, 2016). Therefore, it is imperative to develop silvicultural strategies in order to improve the overall weakening state of melojo oak forests located in Sierra Nevada. In this sense, it is already well known the essential role that bacteria usually play in forest ecosystems. Bacteria intervene in important processes related to biogeochemical cycles, also being able to contribute to the general plant fitness through diverse mechanisms, namely by improving the bioavailability of several nutrients and by protecting their plant host against phytopathogenic organisms (Glick, 2012; Lladó *et al.*, 2017).

In this work, we characterised those bacteria associated with the roots of wild forage leguminous plants and melojo oak – in a genotypic, taxonomic, functional or enzymatic way, depending on the case – , in order to develop in the near future forest fire prevention tasks and strategies to improve the state of the forests in the Natural Space of Sierra Nevada.

Firstly, those bacteria inhabiting roots nodules of the leguminous plants *Lathyrus cicera*, *L. intricatus*, *Vicia sativa* subsp. *angustifolia*, *V. disperma*, *Trifolium glomeratum* and *T. cherleri* were characterised with the aim of improving the quality of that forage species naturally growing in Sierra Nevada. The fingerprinting profiles of the 205 bacterial isolates obtained from nodules revealed that those plant species' endosymbionts are genotypically very diverse. The taxonomic analysis based on four chromosomic genes showed that all the selected strains belonged to the *Rhizobium leguminosarum* phylogenetic group. Nevertheless, none of them could be classified into any described species of genus *Rhizobium*. Some strains could belong to novel undescribed species, while the different phylogenetic origin of several strains depending on the considered gene did not allow their classification. On the other hand, the analysis of the nodulation *nodC* gene revealed that all the strains isolated from *Vicia* spp. and *Lathyrus* spp. nodules belonged to symbiovar *viciae*, and those nodulating *Trifolium* spp. corresponded to symbiovar *trifolii*. All these results have already been published (Villadas *et al.*, 2017) and are included in Chapter I of this Doctoral dissertation.

In order to develop a new bioinoculant to be applied to a specific plant host, it is fundamental to analyse in detail the autochthonous prokaryotic community associated to the mentioned host (Kaminsky *et al.*, 2019). Through the pyrosequencing of *rrs* gene amplicons, as well as the ds-cDNA derived from its transcripts, the structure and

composition of the total and potentially active prokaryotic communities dwelling in the rhizosphere of melojo oak was respectively analysed. The obtained results revealed that both total and potentially active core procariomes were dominated by a relatively small number of OTUs highly abundant. When both populations were compared, we found that several OTUs belonging to *Phenylobacterium* and *Pseudomonas*, among other genera, could be synthesising ribosomes actively in spite of their scarce relative abundance in melojo oak's rhizosphere. Therefore, it suggests that the mentioned OTUs may have influence on the considered ecological niche. These results are presented in Chapter II and have already been published (Lasa *et al.*, 2019a).

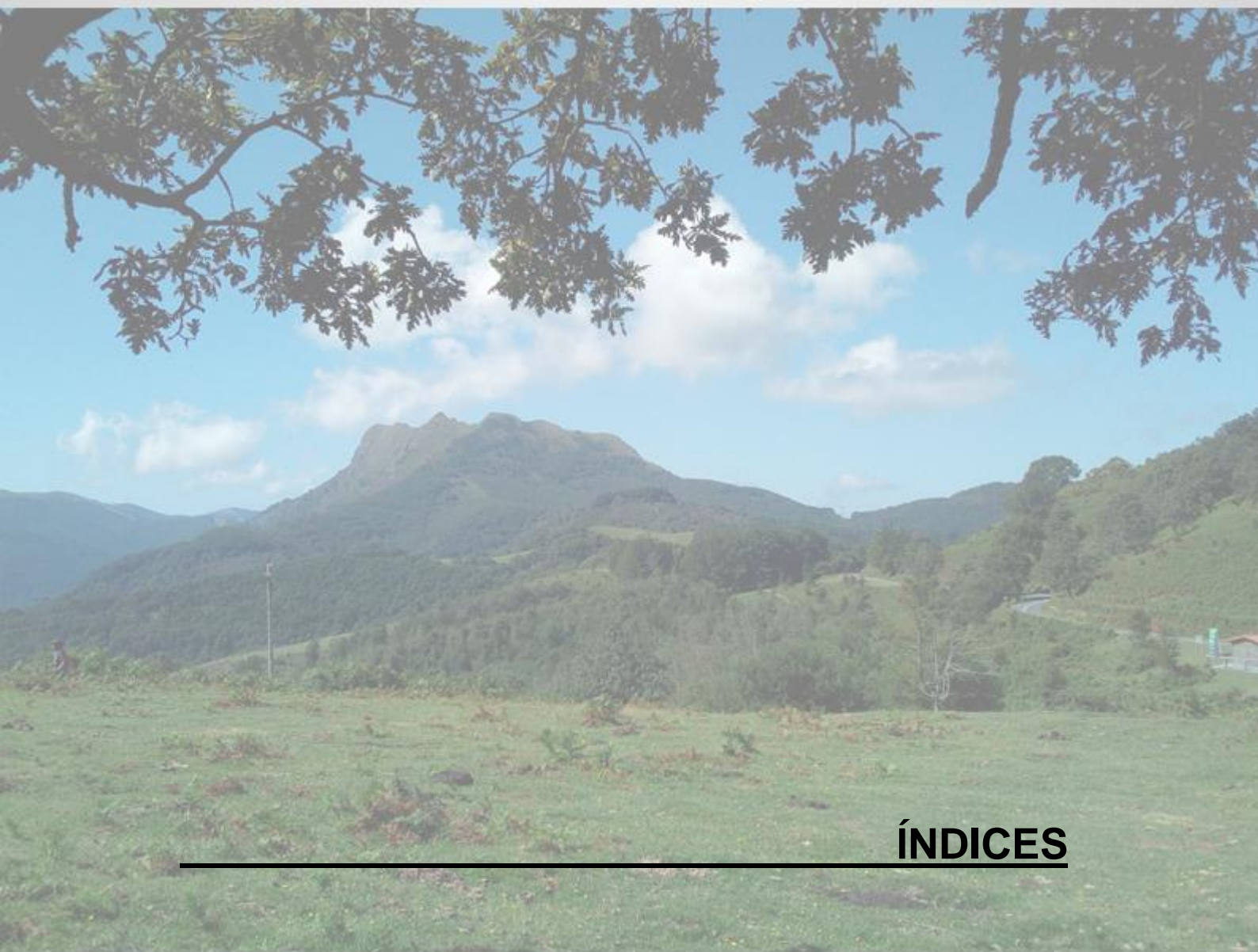
Once the composition and structure of melojo oak's rhizospheric communities were described, further ecological analyses were accomplished by Illumina deep sequencing, with the aim of determining whether the prokaryotic communities of non-inoculated and inoculated melojo oak trees with a bacterial consortium, previously obtained by our research group, were different one year and a half after their transplantation. The comparison of α diversity indices, structure, taxonomical profiles and potential functions performed by prokaryotic members of both communities showed that there were no statistically significant differences between the populations of inoculated and non-inoculated trees, at any of the studied levels (Chapter III).

Given that bacterial inoculation apparently did not alter melojo oak's prokaryotic communities, we sought autochthonous bacteria associated with melojo oak's roots showing plant growth promoting abilities, in order to develop bacterial bioinoculants in the future. On the one hand, we isolated 44 rhizospheric strains belonging to genus *Pseudomonas*, which were genotypically diverse. Some of them belonged to the species *P. lactis*, while others could be affiliated with even five novel species of this genus. On the other hand, 17 isolates were obtained from *Q. pyrenaica*'s root endosphere, all of them belonging to genus *Luteibacter*, probably to species *L. rhizovicinus* (Chapter IV).

Finally, the 61 root-associated bacterial strains were functionally characterised. The ability of the strains to enzymatically decompose plant and fungal biomass was assayed through fluorimetric assays. Specifically, the enzyme deployment strategy of the strains was evaluated by exploring the activity of cell wall-attached and freely-released hydrolytic enzymes. In the case of the strains belonging to genus *Luteibacter*, cell-bound enzymes accounted for most of the total enzymatic activity, whereas the enzyme deployment strategy of *Pseudomonas* strains differed depending on the enzyme considered. Taking heed of the enzymatic activity recorded in both cell-bound and cell-free fractions, it was possible to determine that the strains isolated from root endosphere were able to synthesise a wide range of polysaccharases (cellulases, different types of hemicellulases, and chitinase), in addition to acid phosphatase and lipase. The spectrum of the enzymes produced and the titers of activity were more modest in the case of genus *Pseudomonas*, whose strains expressed 15 enzymes on average. As in the case of genus *Luteibacter*, acid phosphatase and lipase were the enzymes synthesised by all the strains, and those for which the highest activity levels were recorded. Therefore, the results concerning the enzymatic assays (Chapter V and already published, Lasa *et al.*, 2019b) demonstrated that those studied bacteria associated with melojo oak roots could be involved in the organic matter decomposition to a different extent. It also suggests that these strains may contribute to carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P) cycles, essential processes in forest ecosystems (Lladó *et al.*, 2017).

The functional characterisation of root-associated strains culminated in *in vitro* assessments of several direct and indirect plant growth promoting-related traits. In this sense, 18, 22, 31, 38, 39 and 40 strains corresponding to genus *Pseudomonas* were able to express proteases, indole-related compounds, solubilise $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, produce endocellulases, solubilise CaHPO_4 and synthesise siderophores, respectively. In addition, all of the strains were able to produce catalase, tolerate tannic acid, although only two inhibited the growth of several *Quercus*-affecting phytopathogenic fungi, namely *Biscogniauxia mediterranea*, *Diplodia corticola* and *Armillaria mellea*. In a similar way, those strains belonging to genus *Luteibacter* showed the ability to produce siderophores, catalase, indole-related compounds, endocellulase and just two of them, to express proteases. The plant growth promoting potential of 12 strains was confirmed on *Medicago sativa* (alfalfa) plants, while none of the tested strains were able to affect positively *Q. pyrenaica*'s fitness (Chapter VI).

Taking into account all the results obtained along this research work, it is possible to conclude that the Natural Space of Sierra Nevada – and especially root-related ecological niche of wild leguminous plants and woody species such as *Q. pyrenaica* – is a hotspot of bacterial diversity at different levels. This habitat harbours direct and indirect plant growth promoting abilities-showing bacterial members, which may participate in the turnover of some elements such as C, N, P. In addition, the use of bacterial inoculants on melojo oak plantlets with which carry out afforestation tasks seems to be a strategy with an associated low ecological impact. Therefore, it could represent a promising tool in the context of integrated silviculture, although further analyses should be performed in the future to perfect this technology.



ÍNDICES

La imagen muestra bajo un individuo de *Quercus pyrenaica*, el paisaje en el Parque Natural de Peñas de Aia (Gipuzkoa)

Fuente: Ana V. Lasa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

1. Importancia y riesgos a los que se enfrentan los ecosistemas forestales	1
1.1. Ecosistemas forestales de la montaña mediterránea	4
1.1.1. Ejemplo de ecosistema de montaña mediterráneo: Espacio Natural de Sierra Nevada	5
1.1.1.1. Características generales	5
1.1.1.2. Riesgos a los que se enfrenta Sierra Nevada	6
1.1.1.2.1. Cambio global	6
1.1.1.2.2. Incendios forestales	7
1.1.1.2.3. Degradación y debilitamiento de masas boscosas: caso específico de <i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	8
1.1.1.2.3.1. Características generales de la especie	8
1.1.1.2.3.2. Características ecológicas, climáticas y edafológicas	11
1.1.1.2.3.3. Corología actual	11
1.1.1.2.3.4. Importancia ecológica y socioeconómica, y situación actual de las masas de <i>Q. pyrenaica</i>	13
1.1.1.3. Medidas de gestión forestal	15
1.1.1.3.1. Prevención de incendios forestales	15
1.1.1.3.2. Manejo de las masas de <i>Q. pyrenaica</i>	16
2. Holobionte vegetal	17
2.1. Concepto e importancia	17
2.2. La microbiota del holobionte vegetal	18
2.2.1. Microorganismos asociados a las raíces	18
2.2.2. Participación de las bacterias asociadas a las raíces en los ciclos del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P)	20
2.2.2.1. Contribución bacteriana al ciclo del carbono	21
2.2.2.1.1. Descomposición de la materia orgánica	21
2.2.2.1.1.1. Descomposición de la biomasa vegetal	21
2.2.2.1.1.2. Descomposición del micelio fúngico	23
2.2.2.1.1.3. Metabolización de los exudados radiculares	24
2.2.2.1.1.4. Otros procesos	24
2.2.2.1.2. Contribución bacteriana al ciclo del N	24
2.2.2.1.3. Contribución bacteriana al ciclo del P	25
2.2.2.2. PGPB: mecanismos implicados en la promoción del crecimiento vegetal	25
2.2.2.2.1. Mecanismos directos	26
2.2.2.2.1.1. Mejora de la biodisponibilidad de nutrientes	26
2.2.2.2.1.1.1. Fijación de nitrógeno	26
2.2.2.2.1.1.2. Solubilización de fosfato	27
2.2.2.2.1.1.3. Movilización de hierro	28
2.2.2.2.1.1.4. Solubilización de potasio	29
2.2.2.2.1.2. Modulación del nivel de reguladores del crecimiento vegetal	30
2.2.2.2.1.2.1. Síntesis de reguladores del crecimiento vegetal	30

2.2.2.2.1.2.1.1. Citoquininas y giberelinas	30
2.2.2.2.1.2.1.2. IAA, <i>indole-3-acetic acid</i> (ácido indol-3-acético)	30
2.2.2.2.1.2.1.3. Otros compuestos	31
2.2.2.2.1.2.2. Modulación de los niveles de etileno en la planta	32
2.2.2.2.2. Mecanismos indirectos	32
2.2.2.2.2.1. Metabolitos secundarios con actividad antagónica	33
2.2.2.2.2.2. Enzimas líticos	33
2.2.2.2.2.3. Degradación de toxinas o factores de virulencia	34
2.2.2.2.2.4. Mecanismos de competición	34
2.2.2.2.2.4.1. Competición por nutrientes	34
2.2.2.2.2.4.2. Competición por el nicho ecológico	35
2.2.2.2.2.5. Inducción de la resistencia sistémica	35
2.2.2.3. Bioformulaciones basadas en PGPB y/o BCAs	36
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	
M.1. Descripción de las zonas de estudio y demarcación de parcelas	47
M.1.1. Término municipal de Cáñar	47
M.1.2. Término municipal de Lanjarón	48
M.2. Toma de muestras en campo	51
M.2.1. Muestreo de suelo rizosférico de <i>Q. pyrenaica</i>	51
M.2.2. Muestreo de suelo no rizosférico y semillas de plantas leguminosas	52
M.2.3. Muestreo de individuos jóvenes de roble melojo	52
M.3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de la raíz de <i>Q. pyrenaica</i>	52
M.4. Técnicas de biología molecular	53
M.4.1. Extracción de ácidos nucleicos	53
M.4.1.1. Extracción de DNA y RNA de suelo rizosférico	53
M.4.1.2. Extracción de DNA total bacteriano a partir de cultivos líquidos	55
M.4.2. Síntesis de ds-cDNA (<i>double stranded complementary DNA</i> , DNA complementario de doble cadena) a partir de RNA total	55
M.4.2.1. Digestión de DNA	55
M.4.2.2. Síntesis de ss-cDNA (<i>single stranded complementary DNA</i> , DNA complementario de cadena sencilla)	56
M.4.2.3. Síntesis de ds-cDNA	57
M.4.2.4. Obtención de ds-cDNA de extremos romos	58
M.4.3. Amplificación de DNA mediante PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa)	58
M.4.3.1. Amplificación de genes concretos	58
M.4.3.2. Genotipado de cepas mediante marcadores moleculares RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	61
M.4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	61
M.4.5. Purificación de productos de PCR	62
M.4.5.1. Método de purificación directa	62
M.4.5.2. Método de purificación indirecta	63
M.4.5.3. Método de purificación y ultraconcentración	63

M.4.6.	Determinación de la concentración de ácidos nucleicos	64
M.4.6.1.	Método espectrofotométrico	64
M.4.6.2.	Método fluorimétrico	64
M.4.7.	Secuenciación de fragmentos de DNA	64
M.4.7.1.	Secuenciación Sanger de amplicones de DNA	64
M.4.7.2.	Secuenciación masiva de alta calidad de regiones hipervariables del gen <i>rrs</i>	65
M.4.7.2.1.	Preparación y secuenciación de librerías mediante tecnología 454 (Roche)	66
M.4.7.2.2.	Secuenciación mediante tecnología MiSeq (Illumina)	68
M.5. Análisis bioinformático		68
M.5.1.	Procesamiento de secuencias	68
M.5.1.1.	Procesamiento de secuencias obtenidas mediante tecnología Sanger	68
M.5.1.2.	Procesamiento de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva	69
M.5.1.2.1.	Procesamiento de datos obtenidos mediante tecnología 454	69
M.5.1.2.2.	Procesamiento de datos obtenidos mediante plataforma MiSeq (Illumina)	72
M.5.2.	Construcción de árboles filogenéticos	74
M.5.2.1.	Árboles basados en un número reducido de secuencias	74
M.5.2.2.	Árboles basados en un número elevado de secuencias	74
M.5.3.	Construcción de dendrogramas	75
M.5.3.1.	Dendrogramas elaborados a partir de perfiles RAPD	75
M.5.3.2.	Dendrogramas basados en datos numéricos	75
M.5.4.	Análisis ecológico de comunidades procariotas	75
M.5.4.1.	Curvas de rarefacción y cálculo de la Cobertura de Good	75
M.5.4.2.	Estudio de la diversidad alfa (α)	76
M.5.4.3.	Estudio de la diversidad beta (β)	77
M.5.4.3.1.	Consideraciones previas	77
M.5.4.3.2.	Cálculo de distancias entre muestras: distancia Weighted UniFrac	78
M.5.4.3.3.	Métodos exploratorios: ordenación multivariante mediante análisis de coordenadas principales (PCoA, <i>Principal Coordinates Analysis</i>)	78
M.5.4.3.4.	Métodos interpretativos	79
M.5.4.3.4.1.	Adaptación de variables ambientales para análisis de restricción	79
M.5.4.3.4.2.	Identificación de variables ambientales colineales	80
M.5.4.3.4.3.	Análisis canónico de coordenadas principales (CAP, <i>Canonical Analysis of Principal coordinates</i>)	80
M.5.4.4.	Análisis estadístico de la homogeneidad de la dispersión multivariante (PERMDISP2)	81
M.5.4.5.	Análisis multivariante no paramétrico permutacional de la varianza (PERMANOVA, <i>non parametric Permutational Multivariate Analysis of Variance</i>)	81
M.5.4.6.	Definición del <i>core</i> procarioma de la rizosfera de roble melojo	82
M.5.4.7.	Predicción de funciones de las comunidades procariotas rizosféricas	83
M.6. Técnicas microbiológicas		83
M.6.1.	Microorganismos	83
M.6.2.	Medios de cultivo	85

M.6.3. Aislamiento bacteriano	92
M.6.3.1. Aislamiento de bacterias del interior de nódulos de plantas leguminosas	92
M.6.3.2. Aislamiento de bacterias asociadas a la raíz de <i>Q. pyrenaica</i>	93
M.6.3.2.1. Bacterias rizosféricas	93
M.6.3.2.2. Bacterias endófitas de raíz de roble melojo	93
M.6.4. Mantenimiento y conservación a largo plazo de microorganismos	94
M.6.4.1. Cepas bacterianas	94
M.6.4.2. Cepas de hongos y oomiceto	95
M.6.5. Obtención de inóculos bacterianos	95
M.6.6. Caracterización <i>in vitro</i> de las actividades relacionadas con la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal	96
M.6.6.1. Métodos cualitativos y semicuantitativos	96
M.6.6.1.1. Evaluación de la producción de sideróforos	96
M.6.6.1.2. Evaluación de la solubilización de fosfato inorgánico	97
M.6.6.1.3. Evaluación de la actividad CMC-asa o actividad endocelulolítica	97
M.6.6.1.4. Evaluación de la actividad proteolítica	98
M.6.6.1.5. Evaluación indirecta de la producción de ACC deaminasa	98
M.6.6.1.6. Evaluación de la actividad del enzima catalasa	99
M.6.6.1.7. Ensayos <i>in vitro</i> de antagonismo microbiano	99
M.6.6.1.7.1. Enfrentamiento bacteria-bacteria	99
M.6.6.1.7.2. Enfrentamiento bacteria-oomiceto/hongos fitopatógenos	99
M.6.6.1.8. Cuantificación de actividades evaluadas en placa Petri	100
M.6.6.2. Métodos analíticos	100
M.6.6.2.1. Evaluación de la producción de compuestos indólicos	100
M.6.7. Evaluación del metabolismo de ácido tánico	101
M.6.7.1. Ensayo de tolerancia	101
M.6.7.2. Ensayo de utilización de ácido tánico como única fuente de carbono	101
M.7. Técnicas bioquímicas	102
M.7.1. Cuantificación de la actividad de enzimas hidrolíticos en la fracción libre y la asociada a células bacterianas	102
M.8. Ensayos en planta	103
M.8.1. Esterilización y germinación de semillas y desinfección de bellotas	103
M.8.1.1. Semillas de los géneros <i>Lathyrus</i>, <i>Vicia</i>, y <i>Trifolium</i>	103
M.8.1.2. Semillas de <i>Medicago sativa</i> L. ‘Victoria’	104
M.8.1.3. Bellotas de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i> y <i>Q. pyrenaica</i> Willd.	104
M.8.2. Cultivo de plantas	105
M.8.2.1. Soluciones empleadas	105
M.8.2.2. Macetas con plantas-trampa	105
M.8.2.3. Cultivo gnotobiótico en tubos: ensayos de nodulación cruzada	106
M.8.2.4. Cultivo gnotobiótico en jarras Leonard: estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre <i>M. sativa</i>	106
M.8.2.5. Cultivo en macetas: estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre quercíneas	107
M.8.2.6. Cultivo en vivero: inoculación de plantones de <i>Q. pyrenaica</i>	108
M.8.2.7. Tareas de repoblación forestal con plantones de <i>Q. pyrenaica</i>	108
M.8.2.8. Procesamiento del material vegetal: determinaciones biométricas	108
M.9. Análisis estadístico univariante y de variables bidimensionales	108

M.9.1.	Test de normalidad y homocedasticidad	109
M.9.2.	Contrastes paramétricos en poblaciones normales	109
M.9.2.1.	Comparación de medias de muestras homocedáticas	109
M.9.2.1.1.	Comparación de dos grupos	109
M.9.2.1.2.	Comparación de tres o más grupos	109
M.9.2.1.3.	Contrastes <i>post-hoc</i> o no planeados	109
M.9.3.	Contrastes no paramétricos en poblaciones con distribución desconocida	110
M.9.3.1.	Comparación de dos grupos	110
M.9.3.2.	Comparación de múltiples grupos	110
M.9.4.	Correlación de variables bidimensionales	110

RESULTADOS

CAPÍTULO I: Análisis de los rizobios endosimbiontes de especies de las leguminosas *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* empleadas para el mantenimiento de las áreas pasto-cortafuegos del Parque Nacional de Sierra Nevada

I.1. Introducción	117
I.1.1. Leguminosas de pastos naturales	117
I.1.2. Sistemática de rizobios	118
I.1.2.1. Identificación bacteriana	118
I.1.2.2. Simbiovariedades (simbiovares o variantes simbióticas)	119
I.1.3. Promiscuidad de plantas hospedadoras en la interacción rizobio-leguminosa	120
I.2. Diseño experimental	121
I.3. Resultados	122
I.3.1. Aislamiento de cepas y genotipado mediante RAPD	122
I.3.2. Análisis de genes <i>core</i> cromosómicos	125
I.3.2.1. Análisis del gen <i>rrs</i>	125
I.3.2.2. Análisis de genes <i>housekeeping</i>	129
I.3.3. Análisis del gen auxiliar <i>nodC</i>	133
I.3.3.1. Determinación de simbiovares	133
I.3.3.2. Análisis biogeográfico	134
I.3.4. Ensayos de nodulación cruzada	139
I.4. Discusión	140
I.5. Perspectivas futuras	144

CAPÍTULO II: Definición y descripción del *core* procarioma de la rizosfera de *Quercus pyrenaica*

II.1. Introducción	149
II.1.1. Importancia del estudio de la microbiota asociada a especies forestales	149
II.1.2. Las comunidades procariotas prácticamente olvidadas: las comunidades activas	150
II.1.2.1. Estrategias destinadas al análisis de las comunidades procariotas activas	150
II.2. Diseño experimental	152
II.3. Resultados	155

II.3.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de las raíces de <i>Q. pyrenaica</i>	155
II.3.2. Características generales de los datos de pirosecuenciación y diversidad alfa (α)	155
II.3.3. Diversidad beta (β) de las comunidades procariotas	159
II.3.4. Relación entre la estructura de las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo y las propiedades fisicoquímicas del suelo	161
II.3.5. Composición de las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i>	164
II.3.6. Descripción del <i>core</i> -DNA, <i>core</i> -RNA y <i>core</i> -compartido procarióticos de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i>	166
II.3.7. Identificación de taxones del <i>core</i> -compartido de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> con actividad potencial	172
II.4. Discusión	174
II.5. Perspectivas futuras	184

CAPÍTULO III: Estudio del efecto de la inoculación de un consorcio bacteriano sobre las comunidades procariotas rizosféricas de *Quercus pyrenaica* en condiciones de campo

III.1. Introducción	189
III.2. Diseño experimental	191
III.3. Resultados	195
III.3.1. Seguimiento de la supervivencia de los plantones en campo	195
III.3.2. Propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de las raíces	196
III.3.3. Características generales de los datos de secuenciación masiva y diversidad alfa (α)	198
III.3.4. Diversidad beta (β) de las comunidades procariotas	203
III.3.5. Relación entre la estructura de las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo y las propiedades fisicoquímicas del suelo	206
III.3.6. Composición de las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i>	210
III.3.7. Predicción de las funciones llevadas a cabo por las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i>	213
III.4. Discusión	216
III.5. Perspectivas futuras	222

CAPÍTULO IV: Aislamiento, estudio de la diversidad genotípica e identificación taxonómica de bacterias aisladas de la rizosfera y endosfera de raíz de *Quercus pyrenaica*

IV.1. Introducción	227
IV.1.1. Géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Luteibacter</i>	227
IV.1.2. Identificación de bacterias pertenecientes a los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Luteibacter</i>	228
IV.2. Diseño experimental	229
IV.3. Resultados	231
IV.3.1. Aislamiento de bacterias asociadas a la raíz de <i>Q. pyrenaica</i> y genotipado mediante RAPD	231

IV.3.2. Análisis de los genes <i>rrs</i> y <i>rpoD</i>	234
IV.4. Discusión	240
IV.5. Perspectivas futuras	244

CAPÍTULO V: Caracterización enzimática de las cepas asociadas a la raíz de *Quercus pyrenaica*. Determinación de la localización de los enzimas extracelulares producidos implicados en la descomposición de la materia orgánica

V.1. Introducción	247
V.1.1. El papel de las bacterias en la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas forestales	247
V.1.2. Principales protagonistas de la degradación de la materia orgánica: los enzimas extracelulares	249
V.2. Diseño experimental	249
V.3. Resultados	252
V.3.1. Comparación de la actividad de los enzimas excretados y los asociados a las células	252
V.3.2. Potencial de las cepas aisladas de producir de enzimas implicados en la descomposición de la materia orgánica	255
V.4. Discusión	270
V.5. Perspectivas futuras	277

CAPÍTULO VI: Caracterización fenotípica de dos colecciones de bacterias asociadas a la raíz de *Quercus pyrenaica*

VI.1. Introducción	281
VI.2. Diseño experimental	283
VI.2.1. Estudio de las propiedades asociadas a la promoción del crecimiento vegetal	284
VI.2.2. Estudio de las propiedades asociadas al antagonismo de hongos y oomicetos fitopatógenos	285
VI.2.3. Estudio de la tolerancia y utilización de ácido tánico como fuente de carbono	286
VI.2.4. Ensayos <i>in vitro</i> de antagonismo bacteria-bacteria	286
VI.2.5. Ensayos <i>in vitro</i> de antagonismo bacteria-oomiceto/hongos fitopatógenos	287
VI.2.6. Estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre <i>Medicago sativa</i> L. 'Victoria' (alfalfa)	287
VI.2.7. Estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre quercíneas	287
VI.3. Resultados	288
VI.3.1. Estudio de las propiedades asociadas a la promoción del crecimiento vegetal	288
VI.3.2. Estudio de las propiedades asociadas al antagonismo de hongos y oomicetos fitopatógenos	295
VI.3.3. Estudio de la tolerancia y utilización de ácido tánico como fuente de C	297
VI.3.4. Ensayos <i>in vitro</i> de antagonismo bacteria-bacteria	298
VI.3.5. Ensayos <i>in vitro</i> de antagonismo bacteria-oomiceto/hongos fitopatógenos	300
VI.3.6. Estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre hospedadores vegetales	302

VI.3.6.1. Efecto sobre <i>Medicago sativa</i> L. 'Victoria' (alfalfa)	302
VI.3.6.2. Efecto sobre quercíneas: roble melojo (<i>Q. pyrenaica</i>) y encina (<i>Q. ilex</i> subsp. <i>ballota</i>)	303
VI.4. Discusión	304
VI.5. Perspectivas futuras	314
DISCUSIÓN GENERAL	317
CONCLUSIONS	329
BIBLIOGRAFÍA	333
ANEXOS	383

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Resumen de los trabajos realizados en el siglo XXI en los que se inoculan especies forestales con microorganismos promotores del crecimiento vegetal.	38
Tabla M.1. Localización y características principales de las zonas de estudio.	50
Tabla M.2. Composición de la mezcla de reacción empleada para la digestión de DNA en muestras de RNA total.	56
Tabla M.3. Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de ss-cDNA.	57
Tabla M.4. Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de ds-cDNA.	57
Tabla M.5. Composición de la mezcla de reacción de PCR.	58
Tabla M.6. Condiciones de PCR para la amplificación de genes concretos, regiones génicas y secuencias genómicas aleatorias.	60
Tabla M.7. <i>Primers</i> empleados para la amplificación de genes concretos y secuencias genómicas aleatorias.	61
Tabla M.8. Secuencia de los adaptadores, MIDs y <i>primers</i> empleados para la pirosecuenciación de amplicones de las regiones V3-V4-V5 del gen <i>rrs</i> .	67
Tabla M.9. Cepas bacterianas empleadas a lo largo de este trabajo.	84
Tabla M.10. Cepas de hongos y del oomiceto empleadas en este trabajo.	85
Tabla M.11. Composición del medio de cultivo LB.	85
Tabla M.12. Composición del medio de cultivo TY.	85
Tabla M.13. Composición del medio de cultivo YEM.	86
Tabla M.14. Composición del medio de cultivo TSA.	86
Tabla M.15. Composición del medio de cultivo mineral salino.	87
Tabla M.16. Composición del medio de cultivo DF modificado.	88
Tabla M.17. Composición de la Solución 1 constituyente del medio CAS.	88
Tabla M.18. Composición de la Solución 2 constituyente del medio CAS.	89
Tabla M.19. Composición de la Solución 3 constituyente del medio CAS.	89
Tabla M.20. Composición de la Solución 4 del medio CAS.	89
Tabla M.21. Composición del medio de cultivo NBRIP.	90
Tabla M.22. Composición del medio de cultivo YED-P modificado.	90
Tabla M.23. Composición del medio de cultivo YED-P doblemente modificado.	91
Tabla M.24. Composición del medio de cultivo CMC.	91
Tabla M.25. Composición del medio de cultivo SMA modificado.	91
Tabla M.26. Composición del medio de cultivo MEA.	92
Tabla M.27. Composición del medio de cultivo ME.	92
Tabla M.28. Composición del medio de cultivo PDA.	92
Tabla M.29. Relación de sustratos marcados con MUF y enzimas que permiten detectar mediante fluorimetría.	103
Tabla M.30. Composición de la solución nutritiva para plantas de Rigaud y Puppo.	105
Tabla I.1. Características moleculares de las cepas representantes de cada grupo RAPD.	127
Tabla II.1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos bajo la influencia de las raíces de <i>Q. pyrenaica</i> correspondientes a las áreas HAF, BRF y XZF.	156

Tabla II.2. Resumen de los parámetros de calidad de la pirosecuenciación e índices de diversidad α calculados para las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> , tanto para las librerías de DNA como de RNA.	157
Tabla II.3. Distribución de los <i>phyla</i> mayoritarios (> 1%) en al menos uno de los sitios en estudio (HAF, BRF y XZF), considerando las librerías de DNA y RNA.	164
Tabla II.4. Distribución del número de OTUs que forman parte del <i>core</i> -DNA y/o <i>core</i> -RNA por cada subárea y sitio de muestreo.	168
Tabla II.5. Distribución de las familias adscritas a los diferentes órdenes y clases del <i>phylum Proteobacteria</i> , en el <i>core</i> -DNA y <i>core</i> -RNA rizosférico de <i>Q. pyrenaica</i> .	171
Tabla III.1. Supervivencia de los plantones de <i>Q. pyrenaica</i> inoculados y no inoculados tras 18 y 21 meses en campo.	195
Tabla III.2. Propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de las raíces de los individuos de <i>Q. pyrenaica</i> localizados en las diferentes áreas de estudio.	197
Tabla III.3. Resumen de los parámetros de calidad de la secuenciación masiva (Illumina) e índices de diversidad α calculados para las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	202
Tabla III.4. Análisis PERMANOVA, y PERMANOVA por parejas de las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> considerando diferentes factores y grupos de muestras.	206
Tabla III.5. Impacto de los factores fisicoquímicos del suelo bajo la fluencia de las raíces de <i>Q. pyrenaica</i> sobre la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos rizosféricos.	209
Tabla III.6. Proporción de las funciones inferidas para las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> en zonas naturales y de repoblación.	215
Tabla IV.1. Número de aislados obtenidos de la rizosfera y del interior de la raíz de individuos de <i>Q. pyrenaica</i> localizados en HAF y NPF, respectivamente.	232
Tabla IV.2. Características moleculares de las 44 cepas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> , aisladas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	235
Tabla V.1. Actividad de los enzimas asociados a la pared celular y excretados libremente producidos por las cepas pertenecientes a la colección de <i>Luteibacter</i> y <i>Pseudomonas</i> aisladas de la endosfera radicular y rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> , respectivamente.	253
Tabla V.2. Actividad de los enzimas asociados a las células, de los enzimas excretados al medio extracelular y actividad total de las cepas pertenecientes al género <i>Luteibacter</i> .	257
Tabla V.3. Actividad de los enzimas asociados a las células, de los enzimas excretados al medio extracelular y actividad total de las cepas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> .	261
Tabla VI.1. Resultados de la caracterización <i>in vitro</i> de las actividades asociadas a la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal, y de la tolerancia a ácido tánico de las cepas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	293
Tabla VI.2. Resultados de la caracterización <i>in vitro</i> de las actividades asociadas a la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal, y de la tolerancia a	

ácido tánico de las cepas pertenecientes al género <i>Luteibacter</i> aisladas de la endosfera radicular de <i>Q. pyrenaica</i> .	295
Tabla VI.3. Resultados del ensayo <i>in vitro</i> de antagonismo bacteria-bacteria entre las 15 cepas seleccionadas asociadas a la raíz de <i>Q. pyrenaica</i> .	299
Tabla VI.4. Parámetros biométricos de las plantas de <i>M. sativa</i> inoculadas con cada una de las cepas seleccionadas pertenecientes a los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Luteibacter</i> , y de las plantas no inoculadas.	303
Tabla VI.5. Parámetros biométricos de las plantas de <i>Q. pyrenaica</i> y <i>Q. ilex</i> subsp. <i>ballota</i> inoculadas con las cepas seleccionadas pertenecientes a los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Luteibacter</i> , y de las plantas no inoculadas.	304
Tabla A.1. Principales funciones de R empleadas para el análisis estadístico y representación gráfica de los datos en estudio.	385
Tabla A.2. Número de acceso de las cepas tipo del género <i>Pseudomonas</i> en las bases de datos EzTaxon y GenBank® donde se encuentran depositadas las secuencias de los genes <i>rrs</i> y <i>rpoD</i> analizadas, respectivamente.	388
Tabla A.3. Cepas del género <i>Pseudomona</i> significativamente diferentes en cuanto al valor de los índices de actividad (o concentración de equivalentes de IAA por densidad celular) calculados para los mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal determinados en condiciones <i>in vitro</i> .	389

FIGURAS

Figura 1. Aspecto de las diferentes estructuras de <i>Q. pyrenaica</i> .	10
Figura 2. Mapa de la distribución actual de <i>Q. pyrenaica</i> en la España peninsular e Islas Baleares.	12
Figura 3. Interconexión de los ciclos biogeoquímicos del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) en los ecosistemas forestales.	21
Figura M.1. Imagen aérea de los sitios de muestreo.	47
Figura M.2. Esquema de la localización de los <i>primers</i> empleados para la secuenciación del gen <i>rrs</i> .	65
Figura M.3. Representación gráfica de la estructura de la pareja de <i>primers</i> empleados para la pirosecuenciación de amplicones de las regiones V3-V4-V5 del gen <i>rrs</i> .	66
Figura M.4. Representación del comportamiento del medio CAS en presencia de sideróforos.	96
Figura M.5. Representación de la estructura de las placas empleadas para el ensayo de detección de sideróforos mediante el empleo de dos medios de cultivo	97
Figura I.1. Dendrograma obtenido en base a los perfiles RAPD de los rizobios aislados.	124
Figura I.2. Árbol filogenético enraizado basado en las secuencias del gen <i>rrs</i> .	125
Figura I.3. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>recA</i> .	130
Figura I.4. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>atpD</i> .	131
Figura I.5. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>glnII</i> .	132
Figura I.6. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nodC</i> .	134

Figura I.7. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nodC</i> incluyendo las cepas del simbiovar <i>viciae</i> aisladas en este trabajo y en otras localizaciones geográficas.	136
Figura I.8. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>nodC</i> incluyendo las cepas del simbiovar <i>trifolii</i> aisladas en este trabajo y en otras localizaciones geográficas.	138
Figura I.9. Sistema radicular de las plantas de <i>L. intricatus</i> inoculadas con la cepa lc6 (A) y detalle de los nódulos formados en las raíces de dicho hospedador tras la inoculación de la cepa vd8 (B) y <i>R. leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370T (C). Planta de <i>T. glomeratum</i> inoculada con la cepa tc1 (D).	139
Figura II.1. Esquema del diseño experimental y procesamiento de muestras hasta la pirosecuenciación de amplicones correspondientes a las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen <i>rrs</i> .	153
Figura II.2. Curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (3% distancia genética), para las muestras basadas en DNA (A) y en RNA (B).	158
Figura II.3. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	160
Figura II.4. Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP) de las comunidades procariotas totales (librerías de DNA) (A) y potencialmente activas (librerías de RNA) (B) de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	163
Figura II.5. Abundancia relativa promedio de los <i>phyla</i> mayoritarios que habitan la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> , en base a las librerías de DNA (A) y RNA (B).	165
Figura II.6. Porcentaje de OTUs (izquierda) y de secuencias que supusieron los OTUs (derecha) del <i>core</i> -DNA y <i>core</i> -RNA (A y B, respectivamente). C) Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs que componen el <i>core</i> -compartido.	167
Figura II.7. Composición del <i>core</i> bacterioma total (A) y <i>core</i> bacterioma potencialmente activo (B) a nivel de <i>phylum</i> .	169
Figura II.8. Abundancia relativa, expresada porcentualmente, de los órdenes detectados pertenecientes al <i>phylum</i> <i>Proteobacteria</i> en el <i>core</i> -DNA y <i>core</i> -RNA.	170
Figura II.9. Relación existente entre la abundancia relativa de cada uno de los 593 OTUs del <i>core</i> -compartido determinada en base a las secuencias de rDNA y aquella determinada en base a las secuencias derivadas del rRNA.	173
Figura II.10. Distribución del ratio rRNA:rDNA y la abundancia relativa de los OTUs que forman parte del <i>core</i> -compartido de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	174
Figura III.1. Esquema del diseño experimental y procesamiento de muestras hasta la secuenciación masiva (Illumina) de las regiones hipervariables V4-V5 del gen <i>rrs</i> .	192
Figura III.2. Curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (3% distancia genética), para las muestras correspondientes a los robles naturales (HAF, BRF, XZF).	199
Figura III.3. Curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (3% distancia genética), para las muestras correspondientes a los sitios de repoblación forestal (NPF, AZC, AZL).	200

Figura III.4. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de robles de repoblación reciente (AZC, AZL, NPF) (A), y de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y de repoblación no inoculados (B).	205
Figura III.5. Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP) de las comunidades procariotas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	207
Figura III.6. Abundancia relativa promedio de los phyla mayoritarios que habitan la rizosfera de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y de repoblación reciente (NPF, AZC, AZL).	211
Figura III.7. Abundancia relativa promedio de los 10 géneros más abundantes que habitan la rizosfera de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y de repoblación reciente (NPF, AZC, AZL).	212
Figura III.8. Distribución de los géneros <i>Arthrobacter</i> (A) y <i>Bradyrhizobium</i> (B) en la rizosfera de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y robles de repoblación (NPF, AZC, AZL).	213
Figura IV.1. Imagen de los patrones de bandas electroforéticas relativas al genotipado RAPD, correspondientes a las 44 cepas aisladas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	233
Figura IV.2. Dendrograma obtenido en base a los perfiles RAPD de las 17 cepas aisladas de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> .	233
Figura IV.3. Árbol filogenético enraizado basado en la secuencia de los genes <i>rrs</i> y <i>rpoD</i> concatenados.	238
Figura IV.4. Árbol filogenético enraizado basado en las secuencias del gen <i>rrs</i> .	240
Figura V.1. Actividad de los enzimas asociados a la pared celular y excretados libremente, de todas las cepas de la colección correspondiente al género <i>Luteibacter</i> .	254
Figura V.2. Actividad de los enzimas asociados a la pared celular y excretados libremente, de todas las cepas de la colección correspondiente al género <i>Pseudomonas</i> .	255
Figura V.3. Potencial enzimático de las cepas aisladas de la endosfera de la raíz y de la rizosfera de <i>Q. pyrenaica</i> , pertenecientes a los géneros <i>Luteibacter</i> y <i>Pseudomonas</i> , respectivamente.	256
Figura V.4. Perfiles enzimáticos de las cepas pertenecientes a los géneros <i>Luteibacter</i> y <i>Pseudomonas</i> .	270
Figura VI.1. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la producción de sideróforos.	290
Figura VI.2. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la solubilización de CaHPO_4 (A) y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (B) en medio NBRIP.	291
Figura VI.3. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la producción de proteasas en el medio SMA.	296
Figura VI.4. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la producción de endocelulasas con actividad sobre el derivado celulósico CMC.	297
Figura VI.5. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la tolerancia de las cepas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> a ácido tánico en medio LB suplementado con el tanino.	298

- Figura VI.6.** Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de antagonismo bacteria-bacteria en medio YEM (A) y en medio LB (B), siendo las cepas *target* p34 y p60, respectivamente. 300
- Figura VI.7.** Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo preliminar de antagonismo bacteria-*Biscogniauxia mediterranea* 5 (A) y detalle del halo de inhibición en torno a la colonia correspondiente a la cepa p53 (B). 301
- Figura VI.8.** Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo preliminar de antagonismo bacteria-*Armillaria mellea* 860 (A) y detalle de la inhibición del desarrollo micelial y de rizomorfos por parte de la cepa p2, ambos en medio MEA 302

A landscape photograph showing a hillside covered in yellow wildflowers. The foreground is filled with a dense patch of these flowers, while the background shows a rolling hill under a cloudy sky. Two small trees are visible on the distant ridge.

INTRODUCCIÓN

La imagen muestra el paisaje en la zona de muestreo XZF, cubierta por el arbusto *Genista versicolor*.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

1. Importancia y riesgos a los que se enfrentan los ecosistemas forestales

Con una extensión global aproximada de $38 \cdot 10^6$ km², y más de 3 trillones de árboles sobre la Tierra (Crowther *et al.*, 2015), la relevancia de los biomas forestales resulta innegable. Los bosques (boreales, templados o tropicales) proporcionan numerosos servicios ecosistémicos, entendiéndose estos como los beneficios que el ser humano puede obtener de los ecosistemas. Son una fuente importante de diferentes bienes, proporcionando desde productos de mercado (madera y leña, fibras, pastos, alimentos, etc.) hasta servicios reguladores o culturales, entre los que se incluye la protección del suelo, la regulación hidrológica, o la creación de entornos recreativos, entre otros (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Los ecosistemas forestales albergan una elevada biodiversidad a nivel global, además de contribuir en gran medida a la regulación del clima y los ciclos biogeoquímicos de los elementos. Un claro ejemplo es su relevante papel en el ciclo del carbono (C) puesto que la proporción de CO₂ fijado por los productores primarios (e.g., los árboles) puede llegar a exceder considerablemente las pérdidas por respiración (Malhi *et al.*, 1999), actuando pues como sumideros de C.

Sin embargo, el signo del efecto antropogénico sobre los biomas forestales es marcadamente negativo y ancestral. Tal es así, que se estima que la cantidad total de árboles en el planeta se ha reducido en aproximadamente un 45.8% desde la aparición de los humanos. Anualmente tiene lugar la desaparición de aproximadamente 15 billones de árboles y la pérdida de una cobertura vegetal de 192,000 km², debidas fundamentalmente a varios componentes del conocido cambio global¹ (Crowther *et al.*, 2015). Los bosques se ven fundamentalmente afectados por el cambio climático, el cual se encuentra marcado por el incremento de las temperaturas, la variación en el régimen de precipitaciones y el aumento de la frecuencia de episodios climáticos extremos. Además, debe remarcarse la contribución al cambio global de los cambios en la gestión y uso del suelo (deforestaciones y fragmentación de los bosques, abandono de tierras agrícolas, entre otros). Los cambios en la biogeografía de muchas especies, asociados a variaciones, contracciones o expansiones de las áreas de distribución (incluyendo extinciones) y la dominancia en ciertos casos de algunas especies de naturaleza invasiva tienen importantes consecuencias en los biomas forestales (Vericat y Piqué, 2012).

Desde la aparición de los bosques en nuestro planeta (hace aproximadamente 400 millones de años), estos se han visto a sujetos a numerosos e intensos cambios climáticos, ocasionados fundamentalmente por diversos factores geológicos (vulcanismos, tectónica de placas, glaciaciones, etc.) e incluso por colisiones puntuales de asteroides con la Tierra. Los bosques siempre se han recuperado de dichos cambios

¹ En una de las primeras definiciones, el cambio global es descrito como “Cambios en el medio ambiente global (incluyendo alteraciones en el clima, productividad del suelo, océanos y recursos hídricos, química atmosférica y sistemas ecológicos) que pueden alterar la capacidad de la Tierra para sustentar la vida” (101º Congreso de los Estados Unidos, 1990). Se considera que el cambio global se halla integrado por varios componentes como los cambios climáticos, cambios en la composición atmosférica y ciclos biogeoquímicos, cambios en la gestión y uso del suelo, así como por cambios en la distribución de especies y efectos sobre las poblaciones humanas y su economía.

climáticos variando su composición específica, estructura o distribución conforme a los cambios ambientales. Sin embargo, cuando las alteraciones han sucedido de forma rápida los bosques han sido capaces de superarlas, suponiendo ello varias extinciones masivas (Vericat y Piqué, 2012). En este sentido, debe tenerse en cuenta que el ritmo actual del cambio climático es el mayor de los últimos 10,000 años, y que este se produce en un contexto de cambio global, acompañado de una fuerte componente antropogénica que hace que los ecosistemas forestales se encuentren profundamente alterados (Vericat y Piqué, 2012).

1.1. Ecosistemas forestales de la montaña mediterránea

Una de las zonas para las cuales se prevé un mayor impacto del cambio global es la Cuenca del Mediterráneo (McCarthy *et al.*, 2001). Esta se extiende a lo largo de aproximadamente 3800 km de este a oeste, comprendiendo desde el extremo de Portugal hasta las playas de Líbano. De norte a sur su extensión es de unos 1000 km, cubriendo desde el norte de Italia hasta Marruecos y Libia (Sundseth, 2010). Se trata por lo tanto de una zona de transición entre el árido clima del norte de África y aquel templado y lluvioso de Europa central. La región mediterránea constituye un mosaico excepcional de ecosistemas tanto terrestres como acuáticos (marinos y de agua dulce). Es característica la alta biodiversidad que alberga así como su gran variabilidad geológica, edáfica, topográfica y climática. Tal es así, que el rango de precipitación anual se encuentra comprendido entre 100 y 2500 mm, mientras que la temperatura media anual puede oscilar entre 5 y 20 °C, siendo típicos los intensos periodos de sequía, las altas temperaturas estivales y los inviernos fríos y húmedos (Palahí *et al.*, 2008). El clima de la región mediterránea es en ocasiones caprichoso, teniendo lugar en distintos periodos del año repentinos aguaceros torrenciales así como episodios de fuertes vientos (Sundseth, 2010). Así pues, en ciertas ocasiones los bosques mediterráneos se encuentran expuestos a condiciones climáticas extremas, destacando principalmente las pronunciadas sequías y las duras temperaturas del verano.

Las previsiones sobre el cambio global auguran un incremento de las temperaturas y una reducción de la disponibilidad hídrica. Se prevé además un incremento en la frecuencia e intensidad de los periodos de sequía, lo cual es esperable que tenga un fuerte impacto especialmente en los bosques mediterráneos, donde la tasa de transpiración puede llegar a alcanzar hasta un 80% de la precipitación (Palahí *et al.*, 2008). Ello unido a las características climáticas típicas de la región mediterránea hace que los efectos del cambio global sean considerados de especial preocupación en esta región, considerándose que los ecosistemas mediterráneos de montaña – entre ellos los forestales – sean especialmente vulnerables a factores bióticos y abióticos (Palahí *et al.*, 2008; Vericat y Piqué, 2012).

Existen evidencias científicas de que el cambio global afectará a la fenología e interacción entre especies que habitan los ecosistemas forestales mediterráneos (Zamora *et al.*, 2015). Consecuentemente, es previsible que el cambio global suponga alteraciones en la estructura y composición de la vegetación, migraciones altitudinales de especies, decaimiento y aumento de la mortalidad vegetal asociados al estrés hídrico, extinción de especies, incremento de los problemas de regeneración de los bosques, aumento de la extensión de especies invasoras y plagas, aumento del impacto de las perturbaciones (por ejemplo, los incendios forestales) o disminución de la

capacidad de secuestrar C atmosférico en los bosques (Regato, 2008; Serrada Hierro *et al.*, 2011).

1.1.1. Ejemplo de ecosistema de montaña mediterráneo: Espacio Natural de Sierra Nevada

1.1.1.1. Características generales

Cabe destacar que el estado de los ecosistemas forestales mediterráneos es manifiestamente diferente en función de la localización considerada. Así, los bosques del este y sureste se han visto sometidos a lo largo de su historia a una intensa presión humana, encontrándose fuertemente amenazados por la sobreexplotación de los mismos para la obtención de leña, por el clareo para el aprovechamiento agrícola o por el sobrepastoreo. Dichas acciones, combinadas con las duras condiciones climáticas típicas del estío, han acarreado problemas de degradación y deforestación, resultando en una erosión considerable del suelo y en una marcada desertificación de muchas áreas (Palahí *et al.*, 2008).

Como se ha comentado, los ecosistemas mediterráneos de montaña son especialmente vulnerables al cambio global, siendo el Espacio Natural de Sierra Nevada un enclave representativo de este tipo de ecosistemas, y por ende un formidable espejo en el que se reflejan los efectos del cambio global. El mencionado Espacio Natural comprende un extenso macizo montañoso ubicado en el sureste de la Península Ibérica y se encuentra integrado por el Parque Nacional y Parque Natural de Sierra Nevada. Este se extiende a su vez desde el sureste de la ciudad de Granada hasta el extremo occidental de la provincia de Almería, encontrándose ubicado en el corazón de la Cordillera Penibética (Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2019). La superficie total del Espacio Natural de Sierra Nevada es de 172,238 ha, de las cuales 85,883 corresponden al Parque Nacional. En 1986 el macizo de Sierra Nevada fue internacionalmente reconocido como Reserva de la Biosfera, siendo tres años después declarado Parque Natural por el Parlamento de Andalucía dadas las particularidades de la flora, fauna, geomorfología y paisaje que lo caracterizan. Posteriormente, se propuso su declaración como Parque Nacional hasta que en 1999 este fue reconocido y sumado a la Red de Parques Nacionales (Gobierno de España, 1999). Así pues, la declaración e inclusión del Parque Nacional de Sierra Nevada en la Red integrada por dichos Parques, supuso la incorporación a la misma, por primera vez, de los ecosistemas de alta montaña mediterránea. (Gobierno de España. Ministerio para la Transacción Ecológica, 2019).

Localizado entre las coordenadas N 37° 12' 40'', W 03° 32' 51'' y N 36° 56' 26'', W 02° 39' 50'', el Parque Nacional de Sierra Nevada es el macizo de alta montaña más meridional de todo el continente europeo, albergando 15 cumbres que superan los 3000 m de altitud sobre el nivel del mar (msnm), entre ellas la más alta de la Península Ibérica (Mulhacén, 3482 msnm).

La red hidrográfica de Sierra Nevada es amplia y profusa, pues esta se compone de abundantes ríos, arroyos, acuíferos y barrancos con gran influencia de las nieves de las altas cumbres. En el extremo suroccidental el río Ízbor recoge el agua de otros ríos que nacen en el núcleo de Sierra Nevada, mientras que en el norte discurre el río Genil

y en la parte más meridional lo hacen los ríos Guadalfeo, Adra y Andarax. Termoclimáticamente, fuertes diferencias pueden encontrarse entre la vertiente meridional – influida por el mar Mediterráneo – y la vertiente norte, mucho más fría, detectándose a su vez una gran amplitud térmica a lo largo del gradiente altitudinal. En general se considera que los veranos en el macizo de Sierra Nevada son suaves y los inviernos fríos y con frecuentes heladas, situándose la temperatura media anual entre los 5 y 10 °C.

Debido al aislamiento geográfico, a los pronunciados gradientes altitudinales y a la diversidad en cuanto a nichos ecológicos se refiere, el macizo de Sierra Nevada constituye un refugio excepcional para la flora. Tal es así que este enclave se caracteriza por su variada vegetación, comprendiendo desde pastizales de alta montaña hasta matorrales mediterráneos, pasando por piornales e incluso bosques caducifolios. En este enclave se pueden encontrar 2100 especies vegetales catalogadas de las aproximadamente 8000 que se conocen en la Península Ibérica. 116 se encuentran amenazadas y 66 son endémicas de esta región (Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2019). Así, se considera que la flora del Espacio Natural de Sierra Nevada es una de las de mayor valor de Europa. Dichas singularidades, entre otras, han hecho que este Espacio Natural haya recibido ciertos reconocimientos nacionales e internacionales. Es Zona Especial de Conservación, Zona de Especial Protección para las Aves, y consecuentemente Espacio Protegido Red Natura 2000. Además, se considera Red Natural Fluvial y se halla adherido a la Carta Europea de Turismo Sostenible (Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2019). Sierra Nevada es un área montañosa excepcional para la realización de estudios sobre el cambio global, ya que los gradientes altitudinales representan cambios similares a los que se podrían observar a lo largo de los gradientes latitudinales en una escala temporal mayor, pero a menor escala espacial. Es por ello por lo que Sierra Nevada fue incluida entre las 28 Reservas de la Biosfera de Montaña de la Red Internacional de Investigación y Seguimiento del Cambio Climático, en el marco del proyecto internacional de la UNESCO denominado GLOCHAMORE (*Global Change in Mountain Regions*), enfocado hacia el seguimiento del cambio global en las regiones montañosas (UNESCO, 2019a). En la continuación del mencionado proyecto, conocida como GLOCHAMOST (*Global and Climate Change in Mountain Sites*), Sierra Nevada fue una de las diez Reservas de la Biosfera seleccionadas a nivel mundial para estudiar la influencia del cambio global y en especial del cambio climático (UNESCO, 2019b).

1.1.1.2. Riesgos a los que se enfrenta Sierra Nevada

1.1.1.2.1. Cambio global

Ambos proyectos de la UNESCO han permitido confirmar la llegada y el asentamiento del cambio global, y prevén una prolongación del mismo en el macizo de Sierra Nevada. Así, entre los años 1960 y 2010 se ha registrado un aumento de las temperaturas medias anuales y un descenso de las precipitaciones en Sierra Nevada, tendencias que se acentúan en las cotas más altas (Pérez-Luque *et al.*, 2015a). Las simulaciones meteorológicas realizadas para este Espacio Natural auguran una continuación de las tendencias observadas para finales del presente siglo,

prediciéndose un incremento de las temperaturas máximas de entre 2.56-6.22 °C, y un ascenso de 1.81-4.38 °C de las temperaturas mínimas. Los modelos también prevén un descenso en las precipitaciones, si bien la incertidumbre asociada a las simulaciones sobre esta variable no permite adelantar cifras concretas (Pérez-Luque *et al.*, 2015b). En este mismo contexto, se ha registrado una clara tendencia descendente de la duración de la presencia de la nieve, la cual se acentúa conforme se avanza en altitud (reducción de 3.8 días de duración de la nieve a 2500 msnm entre los años 2010-2014). Lamentablemente, también se ha observado una progresiva pérdida de hielo glaciar relictos del circo glaciar de El Corral del Veleta. Así pues, es previsible que las alteraciones en el estado y comportamiento de la cubierta de nieve asociadas al cambio global afecten al correcto funcionamiento de bosques, matorrales, ecosistemas acuáticos e incluso a las actividades agrícolas desarrolladas en Sierra Nevada (Zamora *et al.*, 2015). Sin embargo, los efectos recién mencionados constituyen tan solo algunos de los ejemplos de los múltiples que afectan a este Espacio Natural.

1.1.1.2.2. Incendios forestales

El progreso socioeconómico experimentado desde comienzos del siglo XIX asociado al desarrollo industrial ha supuesto un importante éxodo rural en España. En el caso específico de Sierra Nevada, la montaña ha sido intervenida secularmente, conformándose en consecuencia un bosque antropizado fuertemente dependiente de la intervención del ser humano. Así, el abandono de las prácticas agrícolas que contribuían al mantenimiento del paisaje en esta zona ha supuesto una matorralización y homogeneización del mismo, encontrándose el paisaje homogéneo en alto riesgo de sufrir incendios (Lasanta *et al.*, 2006). Al mismo tiempo debe tenerse en cuenta que las prácticas reforestadoras llevadas a cabo fundamentalmente durante mediados de la década de los 40 y hasta bien avanzada la década de los 50, supusieron la introducción de excesivas especies resinosas a alta densidad de pies por hectárea (Gómez Zotano *et al.*, 2005). Por otro lado, tal y como se ha mencionado, es previsible que en la zona mediterránea, y particularmente en Sierra Nevada, tenga lugar un incremento de las temperaturas y un descenso de las precipitaciones a consecuencia del cambio global, lo cual se considera que lleva asociado un aumento en la frecuencia de los incendios forestales (Pausas, 2004). Así pues, el cambio del uso del suelo y el cambio climático son considerados como dos factores altamente influyentes sobre la frecuencia de los incendios forestales.

En líneas generales, los incendios suponen una importante alteración de los ecosistemas forestales. Así, el fuego afecta al ciclo de los nutrientes, supone la mortalidad de los árboles, cambios en la dirección de la sucesión ecológica, induce la germinación de las semillas de algunas especies, supone una pérdida del banco edáfico de semillas, conlleva cambios en las capas orgánicas superficiales del suelo y en los tejidos reproductivos y las raíces de las plantas, además de promover la volatilización de ciertos componentes del suelo (Whelan, 1995).

Debe mencionarse que en España, durante el periodo comprendido entre los años 2008-2017 se registró un promedio anual de 12,573 siniestros², siendo el año 2018 aquel del último decenio para el que se reportó un menor número de siniestros (7143). La superficie total afectada por el fuego en el año 2018 (29,901.47 ha) también resultó inferior al promedio anual registrado para la época del 2008 al 2017, siendo esta de 132,113.69 ha (Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019). En el caso concreto de Sierra Nevada, aunque fuera de los periodos temporales recién mencionados, no debe olvidarse el devastador incendio acaecido el 22 de septiembre de 2005. Este arrasó una superficie de 3416.74 ha, encontrándose más del 95% del área total afectada entre los límites del Parque Nacional y del Parque Natural. Por los innumerables daños ocasionados tanto en la flora como en la fauna, el incendio de 2005 fue considerado como una absoluta catástrofe ecológica (Gómez Zotano *et al.*, 2005).

1.1.1.2.3. Degradación y debilitamiento de masas boscosas: caso específico de *Quercus pyrenaica* Willd.

1.1.1.2.3.1. Características generales de la especie

El género *Quercus* (familia *Fagaceae*) incluye diferentes especies de quercíneas entre las que se encuentra *Quercus pyrenaica* Willd., la cual también es conocida como roble melojo, rebollo o marojo, si bien los nombres vernáculos que recibe dependen de la zona geográfica que se considere (Jiménez Sancho *et al.*, 1997).

Se trata de una fagácea de longevidad media de 300 años, cuya talla puede oscilar entre 15 y 25 m, y con marcados caracteres morfológicos y fisiológicos que han permitido su adaptación a los climas continentales y mediterráneos. Destaca la marcescencia de esta especie: aun secas, las hojas permanecen en las ramas en invierno para proteger las yemas y los nuevos brotes, y caen durante la brotación. Este comportamiento le permite adaptarse a las bajas temperaturas a las que se puede enfrentar, y además, gracias a su tardía brotación es capaz de reducir el daño ocasionado por nevadas y heladas que pueden acaecer bien avanzada la estación primaveral (Jiménez Sancho *et al.*, 1997). En la Figura 1A y B se muestra el aspecto de las hojas y las flores de esta especie.

La singularidad de esta especie reside a su vez en su capacidad para habitar regiones con una marcada sequía y fuertes insolaciones veraniegas. Es el denso tomento presente en el haz y el envés de sus hojas (Figura 1C y D) lo que le permite captar la humedad ambiental y reducir la pérdida de agua por evapotranspiración (Charco, 2002). Dicho rasgo anatómico además hace que el roble melojo sea fácilmente distinguible del resto de especies de robles y quercíneas de la Península Ibérica.

Llama la atención la prominencia de su sistema radicular, el cual se caracteriza por una raíz principal muy profunda y desarrollada que le permite acceder al agua presente en las zonas más hondas del suelo. Asimismo destacan las abundantes raíces laterales muy superficiales que emiten numerosos vástagos aéreos, dando lugar a la

² El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019) considera los *siniestros* como la suma de *conatos* (incendios que afectan a menos de 1 ha) y de *incendios* (afección por el fuego de una superficie superior a 1 ha).

formación de pies jóvenes o *chirpiales* alrededor del tronco de árboles adultos (Jiménez Sancho *et al.*, 1997; Castillo Marín y Castillo Marín, 2010). La floración es tardía, aproximadamente en mayo, produciéndose las bellotas en los meses de octubre-noviembre. Es de remarcar la naturaleza vecera de esta especie y la baja producción de fruto en comparación con otras quercíneas (Lora González *et al.*, 2008). En la Figura 1E se muestra el aspecto de las bellotas de roble melojo.

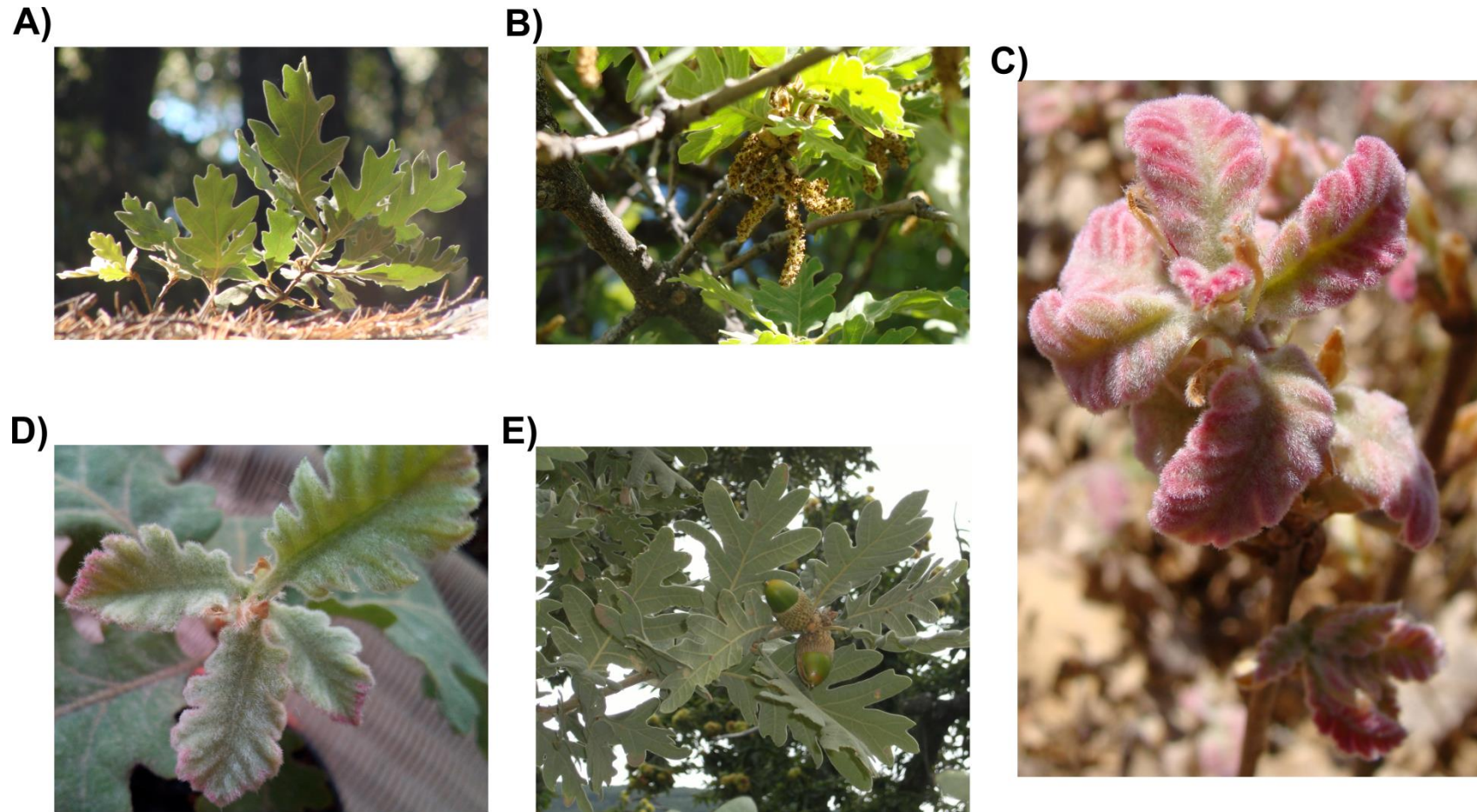


Figura 1. Aspecto de las diferentes estructuras de *Q. pyrenaica*. A) morfología lobulada de las hojas, B) amento de roble melojo, C) color rosáceo típico de las hojas jóvenes de roble melojo, pudiéndose apreciar el tomento de las mismas, D) hojas jóvenes con abundante tomento y E) bellotas de roble melojo. Fuente: Manuel Fernández-López y Ana V. Lasa.

1.1.1.2.3.2. Características ecológicas, climáticas y edafológicas

El roble melojo es considerado como una especie relictiva de épocas frías y húmedas (Lora González *et al.*, 2008). En cuanto a sus necesidades hídricas, anualmente precisa una precipitación media superior a 600 mm (Castillo Marín y Castillo Marín, 2010) aunque cabe destacar que en la mayor parte del área de distribución de *Q. pyrenaica* la precipitación anual media se encuentra comprendida entre 650 mm y hasta 1200 mm (García y Jiménez-Mejías, 2009). A pesar de que precisa una relativa abundancia de precipitaciones, el roble melojo es capaz de soportar la sequía del estío típica del clima mediterráneo, si bien la escasez de agua es uno de los principales factores limitantes del desarrollo de esta especie leñosa (Jiménez Sancho *et al.*, 1997; Nieto Quintano *et al.*, 2016).

Se considera a su vez una quercínea muy resistente al frío y a los fuertes contrastes térmicos, tolerando unas temperaturas que pueden oscilar entre -5 y 7 °C en invierno y 12-22 °C en verano. Cabe destacar que se trata de una especie con clara preferencia por zonas umbrías, lo cual le permite disminuir los niveles de evapotranspiración.

El rango de altitudes entre las que los melojos pueden desarrollarse es ciertamente amplio, encontrándose desde los 290 (País Vasco) hasta los 2000 msnm en Sierra Nevada (Vilches de la Serna, 2014), si bien la franja más habitual en la que esta especie se encuentra es entre los 400 y 1400 msnm de altitud (Castillo Marín y Castillo Marín, 2010).

En lo que respecta a los factores edáficos, *Q. pyrenaica* es clasificada como una especie silicícola dada su marcada preferencia por suelos silíceos. Habitualmente se encuentra sobre multitud de rocas de naturaleza ácida como cuarcitas, pizarras, granitos, areniscas, entre otros, siendo los suelos de textura arenosa o franco-arenosa sus preferidos (Castillo Marín y Castillo Marín, 2010; Nieto Quintano *et al.*, 2016). Aunque la presencia del roble melojo sobre calizas es muy limitada, esta especie es capaz de desarrollarse también en este tipo de suelos. Ello ocurre únicamente en condiciones de alta pluviometría, cuando la lluvia conduce al lixiviado y la decarbonatación del suelo y acumulación de arenas sobre las que desarrolla (García y Jiménez-Mejías, 2009). En general se considera que predomina en suelos oligotrofos (Jiménez Sancho *et al.*, 1997).

En definitiva, los requerimientos ecológicos de esta especie forestal se encuentran entre los típicos de los robles atlánticos y aquellos correspondientes a los de las especies más esclerófilas del género *Quercus*. Además, debe mencionarse que la climatología y edafología son los principales factores que condicionan y determinan la distribución del roble melojo (García y Jiménez-Mejías, 2009).

1.1.1.2.3.3. Corología actual

Las exigencias ecológicas ya citadas condicionan el área de distribución del roble melojo. Así pues, esta especie se halla distribuida en las zonas de transición entre las áreas montañosas mediterráneas sub-húmedas del sureste europeo, hasta las zonas en las que se dan condiciones mediterráneas semi-áridas (Hernández-Santana *et al.*,

Introducción

2008). Las principales masas de roble melojo se hallan en la Península Ibérica, suponiendo un 95% de la corología total de la especie (Nieto Quintano *et al.*, 2016). Le sigue su presencia en Francia, tanto en el País Vasco francés como en el límite norte de su corología, Bretaña. La zona más meridional en la que se encuentra es el noroeste de África, concretamente en la región del Rif (Ruiz de la Torre y Ceballos, 1979).

Debido a su preferencia por los suelos silíceos, en la Península Ibérica predomina en la mitad occidental, y más concretamente en el cuadrante noroeste. La presencia de *Q. pyrenaica* es más esporádica en la mitad oriental donde abundan los sustratos litológicos calizos (Castillo Marín y Castillo Marín, 2010) y el clima es más seco y con menor influencia atlántica.

Así pues, las principales masas de roble melojo se encuentran en los sistemas montañosos próximos a la cuenca del Duero y el Sistema Central. En otras regiones como la zona atlántica (norte de Galicia y toda la franja cantábrica) y el Sistema Bético, el roble melojo es abundante aunque no es posible encontrar masas extensas sino fragmentadas. Existen melojares localmente frecuentes en el Sistema Ibérico sur, Montes de Toledo y Sierra Morena. En la zona más oriental de su distribución, la presencia de esta especie es muy minoritaria, pudiéndose encontrar pies aislados en las sierras de Prades, Penyagolosa, y macizo de Espadán (Jiménez Sancho *et al.*, 1997; García y Jiménez-Mejías, 2009). En la Figura 2 se representa la presencia de *Q. pyrenaica* en la España peninsular.

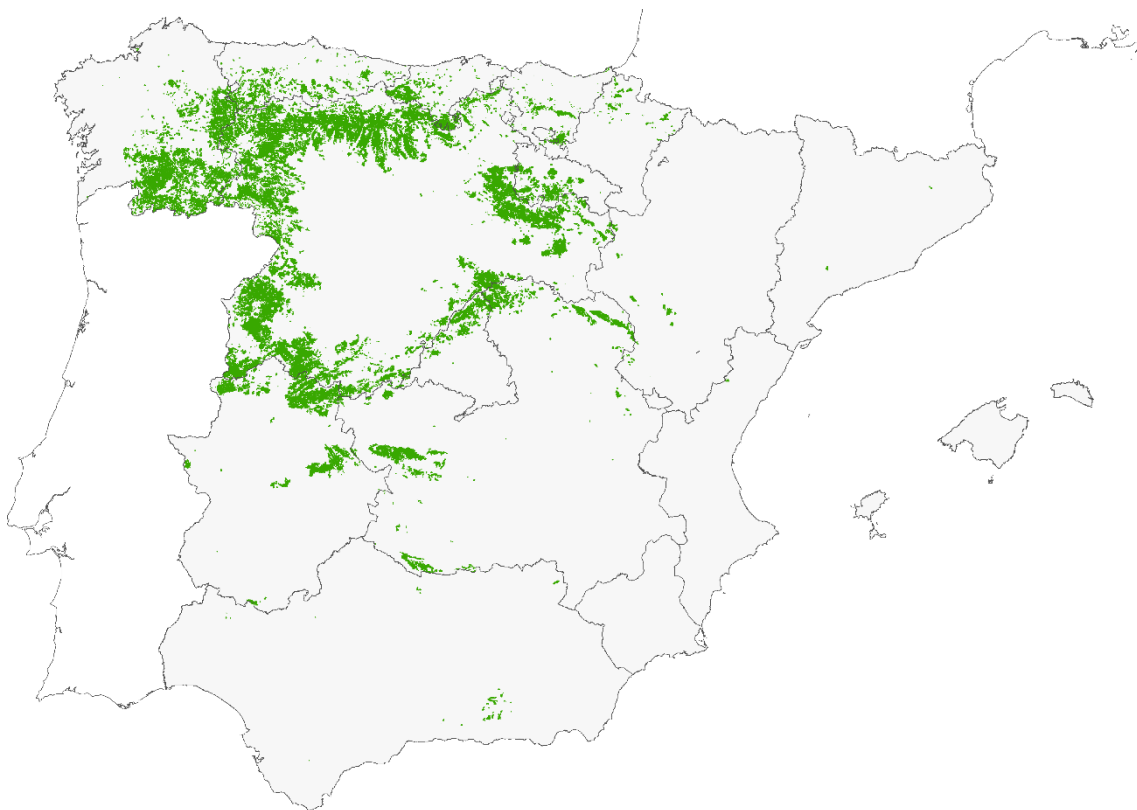


Figura 2. Mapa de la distribución actual de *Q. pyrenaica* en la España peninsular e Islas Baleares. El color verde denota la presencia de la especie. Figura modificada de Alía-Miranda *et al.*, 2009.

Cabe destacar que en el sur peninsular (Andalucía, principalmente) el roble melojo se encuentra acantonado en cotas montañosas altas, concretamente en las zonas próximas a los principales ríos, donde la escasez de precipitación veraniega se ve compensada por el aporte de humedad de los mismos o por el aire húmedo procedente del mar Mediterráneo. Así pues, en Sierra Nevada ocupa un rango altitudinal aproximado entre los 1800 y 2000 msnm, encontrándose las masas más extensas cerca del nacimiento de los ríos Alhama de Lugros, Genil, San Juan, Monachil, Darro (Martínez y Molero, 1982), así como en los montes de Cáñar, Soportujar, Pórtugos o Busquístar (Blanco *et al.*, 1997). Destacan también los melojares situados en los barrancos de Maitena, Poqueira y Trévez (Jiménez Sancho *et al.*, 1997). En Sierra Nevada, el roble melojo ocupa una extensión aproximada de 3500 ha.

1.1.1.2.3.4. Importancia ecológica y socioeconómica, y situación actual de las masas de *Q. pyrenaica*

El principal valor de esta quercínea no estriba en los productos que de ella se pueden derivar, sino en los importantes servicios de no mercado que proporciona. Una de las funciones ecosistémicas que caracterizan a los melojares es la capacidad protectora de los suelos sobre los que se desarrollan. La caída de las hojas con el consiguiente aporte de oxalato cálcico a partir de las mismas, contribuye a que el pH de los horizontes superficiales de los suelos que habitan se acerque a la neutralidad (García y Jiménez-Mejías, 2009), generando las denominadas *tierras de melojares* (Vilches de la Serna, 2014). Asimismo, el aporte de nutrientes que supone la deposición también de flores, ramillas, frutos, etc., hace que el roble melojo sea considerado un excelente formador de suelos fértiles. En numerosas ocasiones, incluso masas arbóreas degradadas recubren zonas de marcada aridez y suelos considerablemente limitantes, quedando por tanto reflejada la capacidad de atenuación de la erosión del suelo de esta especie (Jiménez Sancho *et al.*, 1997; Vericat y Piqué, 2012).

Por otro lado, los melojares son considerados importantes reservorios de biodiversidad en la Península Ibérica ya que numerosas especies de flora y fauna se encuentran asociadas a estas formaciones boscosas (Vericat y Piqué, 2012; Nieto Quintano *et al.*, 2016).

La distribución actual de los robledales y su conservación se encuentran condicionados por variables de tipo biofísico (orientación, condiciones climáticas, disponibilidad hídrica), por los efectos del cambio climático así como por el cambio de uso del suelo que estas formaciones han experimentado. *Q. pyrenaica* ha sufrido una intensa historia de manejo durante los últimos siglos, estando muy presente en la vida diaria del ser humano dado los múltiples usos que a los productos derivados de esta especie se les ha dado. Así, los robledales se han visto sometidos a ciclos de tala periódicos en monte bajo (Salomón Moreno, 2015) principalmente para la obtención de material combustible (leña o carbón) y madera, destinada a las ferrerías, para la fabricación de vigas, traviesas de vías férreas, material de construcción, barricas e incluso para la industria papelera. Destaca a su vez la utilización antaño de la corteza de esta especie en el curtido de pieles y cueros por su alto contenido en taninos (Jiménez Sancho *et al.*, 1997; Salomón Moreno, 2015). En menor medida, las masas de roble melojo han sido también adeshas para el uso ganadero, mientras que el aprovechamiento agrícola de la montaña ha supuesto el descuaje y/o los incendios

controlados de los bosques de roble melojo. Sin embargo, desde mediados del siglo XX estos bosques fueron experimentando profundos cambios. Por un lado, los productos derivados del roble melojo cayeron en desuso y con ello el interés socioeconómico por esta especie. Por otro lado, debido al éxodo rural los cultivos tradicionales de montaña comenzaron a abandonarse, lo cual ha supuesto una densificación excesiva de algunos robledales (Bonet *et al.*, 2015). Así, como consecuencia del uso intensivo seguido del posterior abandono de los melojares junto con el cese del cultivo agrícola de montaña, las masas de *Q. pyrenaica* se encuentran a día de hoy muy degradadas.

Los robledales nevadenses afrontan numerosos riesgos que ponen en compromiso su propia supervivencia. En Sierra Nevada, los melojares se enfrentan a acusados problemas de regeneración sexual que afectan por tanto al funcionamiento y estructura de los mismos. Por un lado se ha observado que además de su inherente vecería, en cotas bajas la producción de flores y bellotas es significativamente inferior a la registrada a mayor altitud, lo cual a su vez se suma a la mayor afección de los robles en las cotas bajas al clima cálido y seco. Además, durante las tres últimas décadas la densidad del arrendajo (*Garrulus glandarius*, ave dispersante de bellotas), se ha visto reducida considerablemente (Zamora y Barea-Azcón, 2015). Por otro lado, se ha constatado un aumento de los daños asociados a la herbivoría causada por ungulados, así como un aumento de la incidencia de ciertos insectos defoliadores, lo cual a su vez parece tener un efecto en la producción de bellotas. A dichos marcados problemas de regeneración se suman las dificultades para su expansión natural, debidas fundamentalmente a la alta densidad de los pinares de repoblación próximos a los melojares que dificultan la colonización por el roble en Sierra Nevada (Bonet *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, los importantes requerimientos hídricos del roble melojo hacen que esta especie se vea fuertemente afectada por el descenso de las precipitaciones asociado al cambio climático.

A todo ello debe añadirse el reemplazo habitual de las masas de *Q. pyrenaica* por otras leñosas de mayor beneficio económico y requerimientos ecológicos similares como castaño, fresno, pino, o por las especies más esclerófilas del género y mejor adaptadas a la sequía; esto es, encina, alcornoque e incluso roble quejigo (Castillo Marín y Castillo Marín, 2010).

La combinación de todos los factores mencionados hace que el roble melojo en Sierra Nevada y en gran parte de la Península Ibérica adolezca de vigor vegetativo, siendo característica la seca de ramas, el estancamiento del crecimiento así como su porte arbustivo. Tal es así que es frecuente encontrar grandes extensiones de esta especie en forma de monte bajo, y las escasas ocasiones en las que *Q. pyrenaica* se encuentra como monte alto, entonces aparece como especie subordinada acompañante (Lora González *et al.*, 2008). Se produce además un proceso de retroalimentación positiva, ya que el debilitamiento generalizado de las masas las hace más vulnerables a plagas, enfermedades e incendios forestales. Además de la degradación de estos bosques, se ha documentado una considerable fragmentación de los mismos, y un retroceso en el número de ejemplares de esta especie (Aspizua *et al.*, 2012).

Así, debido al avanzado estado de deterioro y a la notable fragmentación del hábitat de esta especie, en el año 1994 esta quercínea fue incluso declarada como *vulnerable* en el Catálogo Andaluz de Especies de la Flora Silvestre Amenazada (Junta

de Andalucía, 1994). Nueve años después, según la Ley 8/2003 de la flora y fauna silvestres, el estado de clasificación de *Q. pyrenaica* varió a “Especie de especial interés” (Gobierno de España, 2003), requiriendo así la elaboración de un Plan de Manejo según dicha ley.

1.1.1.3. Medidas de gestión forestal

Ante la situación actual y la previsión para el futuro de pérdida de funcionalidad de los ecosistemas forestales, ciertos autores consideran que es de vital importancia tanto conservar los bosques como tomar medidas para su recuperación (Aerts y Honnay, 2011). A continuación se exponen varios ejemplos de estrategias de gestión forestal de especial relevancia en los ecosistemas mediterráneos de montaña, considerando los principales riesgos a los que se enfrentan.

1.1.1.3.1. Prevención de incendios forestales

Tal y como se ha comentado (Apartado 1.1.1.2.2.), en un escenario de cambio global los ecosistemas forestales de la región mediterránea se ven enormemente amenazados por el riesgo de ser arrasados por el fuego. Las estrategias de silvicultura preventiva generalmente se resumen a las redes de cortafuegos, esto es, zonas de baja combustibilidad localizadas en puntos estratégicos de los montes, diseñadas para contener la extensión del fuego y permitir especialmente la extinción del mismo por las brigadas antiincendios. Dichas estructuras preventivas requieren un mantenimiento regular para reducir la cantidad de material vegetal combustible presente, lo cual es generalmente realizado mediante medios mecánicos. Esta estrategia, si bien clásica y ampliamente utilizada, se considera económicamente costosa y de eficiencia limitada ya que no mejora la resiliencia del propio ecosistema frente al fuego, ni mimetiza ningún proceso ecosistémico (Ruiz Mirazo, 2011).

Empero, el ganado puede realizar la misma función de mantenimiento mediante ingesta de la vegetación presente en los cortafuegos, habiéndose demostrado ya la eficiencia del mismo para controlar el crecimiento de la hierba y los matorrales en áreas mediterráneas (Jauregui *et al.*, 2007). De esta manera, surge una estrategia de gestión silvopastoral integrada, en la que el pastoreo es planificado de tal forma que el ganado se alimenta de la vegetación presente en los cortafuegos, suponiendo por tanto el mantenimiento de los mismos. Mediante el pastoreo controlado y no excesivamente intenso es posible por tanto transformar la carga combustible indeseada en un recurso pascícola de gran valía. Así, Ruiz Mirazo (2011) propone el término preciso *área pasto-cortafuegos* definiéndolo como “una zona de baja combustibilidad, ubicada estratégicamente en el monte, que es gestionada mediante pastoreo con ganado para contrarrestar el desarrollo natural de la vegetación y así mantenerla en condiciones adecuadas para la prevención de incendios forestales”.

Cabe destacar que el mantenimiento de la baja combustibilidad de estas zonas gracias al ganado no implica que desaparezca la necesidad de la intervención mecánica, pero sí permite que esta sea retrasada en el tiempo. Así, el pastoreo en las áreas pasto-cortafuegos es una estrategia de gestión preventiva complementaria que se muestra sostenible y mejora la multifuncionalidad del bosque. Además, ejerce efectos positivos sobre la biodiversidad dado que permite mantener la cubierta vegetal gracias a la

dispersión de semillas a causa de las deyecciones de los animales (Robles Cruz, 2004). Al mismo tiempo contribuye al desarrollo rural de la zona y por ende a la revalorización del monte. Debe destacarse que en el sureste de Francia y en la comunidad autónoma española de Andalucía, el pastoreo controlado del ganado en áreas cortafuegos ha sido ya incorporado en los programas de prevención de incendios forestales (Thavaud 2006; Ruiz-Mirazo *et al.*, 2011).

Es esencial tener presente que para mejorar la eficiencia del mencionado sistema preventivo de incendios y estimular la presencia del ganado en la zona, debe realizarse una mejora de los pastos, surgiendo la posibilidad de sembrar semillas de especies forrajeras autóctonas que resulten atractivas para el ganado (Robles Cruz, 2004).

1.1.1.3.2. Manejo de las masas de *Q. pyrenaica*

Mejorar la estructura, el funcionamiento y la capacidad de expansión del roble melojo se encuentra entre los principales objetivos de los planes de gestión forestal correspondientes a esta especie (Bonet *et al.*, 2015). Múltiples medidas que atañen al control de factores como las plagas de defoliadores o el exceso de herbivoría y que exceden las cuestiones meramente vegetales, han sido propuestas (Zamora *et al.*, 2015). Para la mejora de la capacidad de expansión de los melojares, se propone la realización de repoblaciones en zonas de montaña adecuadas según las previsiones sobre el impacto del cambio global. Dado que las cotas más bajas se encuentran afectadas en mayor medida que las grandes altitudes por el clima cálido y seco venidero, las predicciones apuntan hacia un ascenso altitudinal de *Q. pyrenaica*. Así pues, una de las propuestas más firmes estriba en la repoblación con esta especie en el límite superior de las formaciones existentes (Aspizua *et al.*, 2012; Bonet *et al.*, 2015).

En tanto, desde 2011 se han realizado tratamientos silvícolas de clara y clareo en pinares de reforestación dominados por *Pinus sylvestris* que se encuentran próximos a robledales, y en un estadio primario de evolución hacia masas mixtas de dicha especie y *Q. pyrenaica*. La densidad de pies en dichos pinares es frecuentemente elevada, por lo que las operaciones de clara y clareo suponen una reducción de la competencia entre especies por la luz, agua y nutrientes, lo cual favorece la extensión del roble hacia esta zona y el desarrollo incluso de otras especies leñosas y arbustivas. Consecuentemente, este modelo de gestión resulta en un aumento de la diversidad estructural y funcional del ecosistema (Aspizua *et al.*, 2012; Bonet *et al.*, 2015). La introducción de plantones de roble melojo en los pinares previamente clareados ha arrojado resultados positivos sobre la extensión de las masas, llegando a observarse una regeneración de entre uno y tres individuos por cada 25 m², aproximadamente (Bonet *et al.*, 2015). Sin embargo, se considera aún temprano para valorar la regeneración de una especie de tan largo periodo de vida. Por este motivo, la mencionada estrategia de gestión de los bosques se muestra aún prometedora.

Debe destacarse que para la optimización de las tareas de repoblación en ecosistemas de montaña con material vegetal procedente de viveros o invernaderos, es preciso obtener plantones vigorosos y resilientes capaces de adaptarse a las frecuentemente duras condiciones forestales (Karličić *et al.*, 2016).

2. Holobionte vegetal

2.1. Concepto e importancia

Gran parte del esfuerzo realizado para descifrar el correcto funcionamiento de los ecosistemas forestales se centra principalmente en los componentes que se hallan sobre el suelo, y en la lucha contra el estrés biótico y abiótico a los que se encuentran sometidos los bosques (Maghnia *et al.*, 2019). En el caso específico del Espacio Natural de Sierra Nevada, la mayoría de los trabajos realizados sobre el cambio global han sido dirigidos hacia el estudio de aspectos físicos o que atañen a los macroorganismos (Aspizua *et al.*, 2012; Zamora *et al.*, 2015). Sin embargo, el papel que desempeñan las comunidades microbianas es crucial en los ecosistemas terrestres (Wagg *et al.*, 2014). Particularmente en los bosques, muchos de los procesos ecológicos que tienen lugar dependen de la actividad de los microorganismos, por lo que el estudio de las comunidades microbianas y el papel que estas desempeñan en dichos ecosistemas se considera esencial para la conservación y recuperación de los bosques.

Así, cuando se ahonda en los componentes específicos de los ecosistemas forestales (véase, por ejemplo, la flora), es importante tener en cuenta que los organismos vivos no son entidades independientes. Las plantas albergan en sus tejidos – tanto externa como internamente – comunidades microbianas con las que interactúan de diversa forma. Mediante múltiples mecanismos, algunos de los cuales se estudian en detalle más adelante (Apartado 2.2.2.2.), los microorganismos contribuyen al desarrollo y supervivencia de las plantas. Así pues, el *fitness* o estado general de las mismas es consecuencia directa tanto de la propia planta como de su microbiota³ asociada (Bulgarelli *et al.*, 2013), totalidad que es conocida con el término *holobionte* (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). El holobionte vegetal es por tanto un sistema multicomponente integrado por el propio hospedador así como por las comunidades microbianas asociadas al mismo, siendo estas consideradas por algunos autores como una fuente adicional de genes y por tanto de funciones que pueden resultar de utilidad para la planta (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015; Thais *et al.*, 2016). La asociación planta-microorganismo casi nunca es considerada estática sino dinámica, por lo que la aplicación del concepto de holobionte requiere la consideración tanto de sus componentes como de las interacciones que se dan entre ambos (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015).

Sin embargo, dada la complejidad de los holobiontes vegetales en términos de composición y funcionalidad, estos son entidades que en la actualidad, en lugar de resultar explicativas *per se*, necesitan realmente ser explicadas. El análisis de la composición y estructura de la microbiota asociada a las plantas es un tema de

³ El progreso metodológico y de capacidad de cálculo experimentado en los últimos años en el ámbito del análisis de las comunidades microbianas ha llevado a un incremento exponencial de la cantidad de trabajos publicados en esta área. Sin embargo, ello ha supuesto en muchos casos confusiones y usos incorrectos de los términos frecuentemente empleados en esta rama de conocimiento. Así, en el presente texto se emplearán las definiciones propuestas por Marchesi y Ravel (2015), considerando a la *microbiota* como “el conjunto de microorganismos presentes en un ambiente concreto”, y diferenciándolo del *microbioma*, el cual es definido por dichos autores como “el hábitat completo, incluidos los microorganismos [...], sus genomas (e.g., sus genes) y las condiciones ambientales circundantes”. Para facilitar su interpretación, este último concepto se basa en el correspondiente a *bioma*.

investigación candente que ha cobrado especial interés durante los últimos años. Gracias a los grandes avances tecnológicos – especialmente los que conciernen a las técnicas de secuenciación masiva – nuestro conocimiento sobre la diversidad del componente microbiano del holobionte se encuentra en creciente expansión. Así, los estudios realizados han explorado la estructura de la microbiota de plantas modelo y de cultivo, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Lundberg *et al.*, 2012), cebada (*Hordeum vulgare*) (Bulgarelli *et al.*, 2015), soja (*Glycine max*) (Rascovan *et al.*, 2016), maíz (*Zea mays*) (Aira *et al.*, 2010), trigo (*Triticum aestivum*) (Donn *et al.*, 2015), arroz (*Oryza sativa*) (Edwards *et al.*, 2015), entre otras. Algunos estudios se han centrado en el análisis de las comunidades microbianas asociadas a plantas leñosas como el álamo negro (*Populus trichocarpa*) (Shakya *et al.*, 2013), e incluso algunas quercíneas (Cobo-Díaz *et al.*, 2017; Fernández-González *et al.*, 2017). En el caso de las especies forestales, mediante estudios descriptivos de la microbiota se han podido dilucidar múltiples aspectos relativos al propio holobionte e incluso al ecosistema que habitan. Así, ha sido posible determinar la influencia de algunos de los factores edáficos que afectan al ensamblaje de las comunidades microbianas (Li *et al.*, 2014), los diferentes perfiles taxonómicos procariotas que caracterizan cada horizonte del suelo, los cambios composicionales en función de la estacionalidad (López-Mondéjar *et al.*, 2015), así como el efecto de la especie vegetal hospedadora sobre la composición de las comunidades microbianas (Bonito *et al.*, 2014), entre otros aspectos.

Cabe destacar que la descripción taxonómica y estructural de las comunidades microbianas permite asentar los cimientos de las estrategias que pretenden integrar el uso de la microbiota en la producción agrícola e incluso forestal, por ejemplo mediante el desarrollo de bioformulaciones. Las comunidades de microorganismos asociados a las plantas son por lo general diversas, y no todos los individuos tienen influencia sobre el fenotipo del hospedador. Así, algunos autores remarcan que la identificación de aquellos microorganismos que ejercen un efecto positivo sobre el hospedador es uno de los pasos iniciales (y esenciales) en aquel tipo de abordajes basados en la microbiota (Busby *et al.*, 2017). Su posterior aislamiento selectivo puede dar lugar a la inclusión de los mismos en colecciones de cultivo y a experimentos de manipulación de la microbiota, de ahí que la descripción de los perfiles taxonómicos de los microorganismos que componen el holobionte vegetal sea uno de los pilares fundamentales para el desarrollo de bioformulaciones. Aunque gran parte de los esfuerzos realizados en este contexto se han focalizado hacia el estudio de la microbiota asociada a plantas de interés agrícola, la aplicabilidad de este tipo de análisis es completamente extrapolable a especies forestales. Por lo tanto, conocer y comprender las comunidades microbianas típicas de dichas especies (tanto a nivel composicional, estructural como funcional), se considera clave en la mejora de la productividad y la funcionalidad, por ejemplo, de los bosques (Aerts y Honnay, 2011; Philippot *et al.*, 2013; Baldrian, 2016).

2.2. La microbiota del holobionte vegetal

2.2.1. Microorganismos asociados a las raíces

El concepto de holobionte comprende la microbiota que habita los diferentes tejidos de un hospedador, bien sea tanto a nivel interno como en su superficie. Uno de los hábitats más estudiados y de mayor relevancia para las plantas es el suelo en el que

se desarrolla su sistema radicular. Se trata de un hábitat complejo en el que reside una amplia variedad de microorganismos (bacterias, arqueas, hongos, oomicetos, protozoos, virus), entre los cuales las bacterias son el componente principal del mismo en términos de biomasa. Si bien la diversidad y el número de bacterias que habitan el suelo dependen de factores edáficos específicos como el tipo de suelo, la temperatura, humedad o pH del mismo, así como del tipo de vegetación presente (entre otros aspectos), típicamente se ha estimado que un gramo de suelo bajo ningún tipo de estrés puede albergar 10^9 células bacterianas (Gans *et al.*, 2005). Cabe destacar que la riqueza bacteriana del suelo que se halla bajo la influencia de las raíces de las plantas (*rizosfera*) es mucho mayor a la que caracteriza al resto del suelo. Este fenómeno, conocido como *efecto rizosférico* (y ya descrito por Hiltner en 1904), es debido fundamentalmente a que entre un 5-21% del C fijado por las plantas es excretado en forma de exudado radicular (Marschner, 1995). Como consecuencia, el hábitat rizosférico es abundante en nutrientes de diversa índole, por ejemplo, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas, entre otros. La composición detallada de los exudados radiculares puede encontrarse en la revisión exhaustiva realizada por Uren (2007).

Sin embargo, la microbiota de las raíces se encuentra comprendida tanto por los microorganismos rizosféricos como por aquellos que habitan el interior de las raíces (endófitos), además de los que se hallan en la rizoplanea o interfase raíz-suelo. En el caso de los endófitos de raíz se ha descrito que pueden ser obligados (incapaces de proliferar en el exterior de los tejidos de la planta), facultativos (aquellos que habitan en el suelo o rizosfera pero pueden penetrar en el interior de la raíz bajo condiciones determinadas) o pasivos, los que acceden al interior de la raíz mediante eventos estocásticos, por ejemplo a través de heridas existentes en los pelos radiculares (Gaiero *et al.*, 2013). En cualquiera de los casos, una vez en el interior de la raíz estos pueden habitar los espacios inter- o intracelulares e interactuar con el hospedador.

Pese a que la microbiota asociada a las raíces se encuentra compuesta por diferentes tipos de microorganismos, de aquí en adelante se va a profundizar exclusivamente en el dominio Bacteria dada su elevada abundancia en la mayoría de suelos, sin exceptuar los forestales. Así, cabe destacar que aunque las plantas son capaces de proporcionarles a las bacterias endo- y rizosféricas diferentes tipos de nutrientes e incluso un nicho ecológico único como es el interior de la planta, estas pueden ejercer un efecto neutro, perjudicial o beneficioso sobre su hospedador. En el caso particular de las interacciones positivas, gran parte de la influencia bacteriana sobre las plantas tiene su origen en el papel que las bacterias desempeñan en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, teniendo consecuencias directas sobre la nutrición vegetal. Así, muchas de ellas son capaces de movilizar nutrientes para las plantas mediante degradación de la materia orgánica o erosión de minerales. En ambos casos, las consecuencias no solo resultan positivas para las plantas sino también para un ecosistema como el forestal, característico por los suelos típicamente pobres en nutrientes y para los cuales apenas existen enmiendas (Uroz *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, aquellas bacterias que afectan positivamente y no ocasionan enfermedad en las plantas son habitualmente conocidas como *bacterias promotoras del crecimiento vegetal* o PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*). Las PGPB pueden encontrarse tanto en la rizosfera como en la endosfera,

estableciendo una relación simbiótica con los hospedadores, o siendo bacterias de vida libre (Glick, 2012). En cualquier caso, se trata de bacterias cuya actividad lleva asociada una mejora de la nutrición vegetal, de la adaptación a condiciones de estrés o la protección frente a organismos fitopatógenos. Todo ello resulta en última instancia en un mayor crecimiento y mejor *fitness* del hospedador (Tabassum *et al.*, 2017).

2.2.2. Participación de las bacterias asociadas a las raíces en los ciclos del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P)

En los suelos forestales, las bacterias participan en la descomposición de la materia orgánica de origen vegetal y fúngica fundamentalmente, tanto en la rizosfera, como en el suelo suelto, la hojarasca o la madera muerta en la que habitan. Como se ha avanzado anteriormente, su contribución con la erosión de minerales del suelo o rocas es también frecuente. Así, su papel en diversos procesos de los ciclos biogeoquímicos de los elementos se encuentra lejos de ser despreciable. Debe destacarse que el rol de las bacterias en los ciclos biogeoquímicos de los elementos es dinámico, no siendo siempre la tasa de degradación de las biomoléculas estable. Además, la descomposición de la materia orgánica depende de su composición, siendo determinante la presencia de polímeros recalcitrantes como los de naturaleza fenólica. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que a lo largo del proceso de descomposición de la materia orgánica tiene lugar una sucesión de los microorganismos y enzimas implicados (Šnajdr *et al.*, 2011). La Figura 3 resume de forma esquemática los principales procesos de reciclado de nutrientes en los que las bacterias asociadas a las raíces participan⁴.

⁴ Dada la interconexión existente entre los procesos que atañen al C, P y N (reflejada en el concepto de *ciclo* de los elementos), resulta difícil analizar los mismos de manera lineal. Así pues, el lector debe tener una perspectiva holística de cada uno de los procesos que se comentan a continuación, en lugar de considerar cada uno de ellos como etapas independientes. Igualmente debe tenerse presente que en un ecosistema como el forestal, coexisten abundantes compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica sobre los cuales los microorganismos – y en el caso que aquí ocupa, las bacterias – actúan también de forma interdependiente. En la presente sección se pretende analizar los procesos de los ciclos de los elementos en los que participan las bacterias, haciendo especial énfasis en todo lo referente a la materia orgánica. Aquellas etapas en las que participan las bacterias y tienen un efecto más directo sobre la salud general de las plantas se abordan con más detalle en las sucesivas secciones (Apartado 2.2.2.1.1.). Es por tanto, una percepción de conjunto la más recomendada para interpretar adecuadamente la contribución neta de las bacterias a los ciclos del C, P y N.

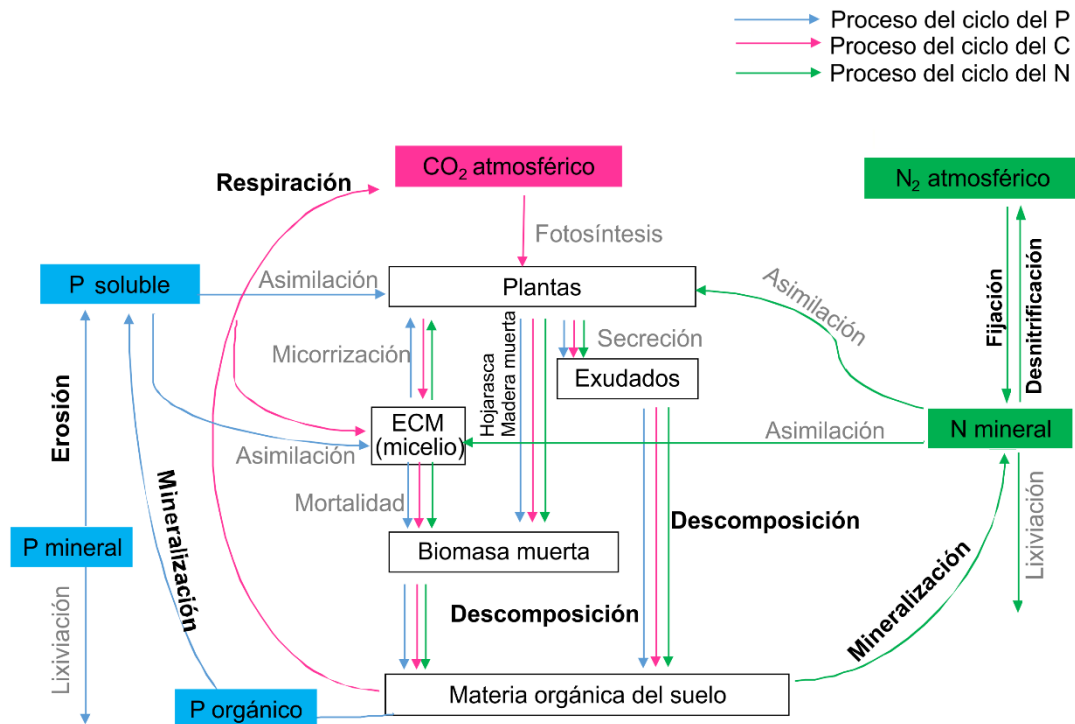


Figura 3. Interconexión de los ciclos biogeoquímicos del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) en los ecosistemas forestales. Las flechas apuntan hacia la transferencia de C (rosa), P (azul) y N (verde) entre los distintos componentes ecosistémicos. Los procesos en los que participan las bacterias se resaltan en negrita. Las etapas relacionadas con la generación y descomposición de la biomasa bacteriana, animal y fúngica no se representan para una mejor interpretación (a excepción de lo referente a las ectomicorizas, ECM [*Ectomicorriza*]). Adaptado de Lladó *et al.*, 2017.

2.2.2.1. Contribución bacteriana al ciclo del carbono

Dado que los suelos forestales almacenan dos tercios del C del planeta (Batjes, 1996), el reciclado de este elemento en el ecosistema forestal es esencial a nivel global. En líneas generales, tras la fijación fotosintética del CO_2 atmosférico y translocación de los fotoasimilados a lo largo de toda la planta, los compuestos vegetales recalcitrantes y los más sencillos llegan al suelo mediante deposición de la producción primaria y exudación radicular, respectivamente. Una vez en el suelo, la biomasa vegetal y la de origen fúngico son degradadas y metabolizadas por las bacterias, para retornar en última instancia el C a la atmósfera mediante la respiración bacteriana (Figura 3).

2.2.2.1.1. Descomposición de la materia orgánica

2.2.2.1.1.1. Descomposición de la biomasa vegetal

Si bien históricamente se ha atribuido la capacidad de descomponer la materia vegetal muerta a los hongos fundamentalmente, varios estudios demuestran que las bacterias contribuyen activamente a este proceso, tanto en la hojarasca como en el suelo (Štursová *et al.*, 2012; López-Mondéjar *et al.*, 2016a). Así, se conocen especies bacterianas capaces de degradar, en mayor o menor medida, los diferentes constituyentes de la lignocelulosa, el principal componente de la biomasa vegetal (Van Dyk y Pletschke, 2012). Bien por la abundancia de dicho compuesto en los ecosistemas forestales o bien por la dificultad que desentraña la degradación de alguno de sus

constituyentes, las bacterias que participan en la descomposición de este elemento, son claves en el ciclo del C.

La lignocelulosa se encuentra compuesta principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, además de por pectina, proteínas, sales y minerales (Van Dyk y Pletschke, 2012). La celulosa es un polisacárido constituido por unidades de β -D-glucosa unidas mediante enlaces β -1,4 que forman cadenas lineales, las cuales a su vez se ven interconectadas mediante puentes de hidrógeno, formando microfibrillas de celulosa. Estas son las responsables de la naturaleza cristalina de este polisacárido, confiriéndole un carácter altamente recalcitrante (Van Dyk y Pletschke, 2012). Una parte de la celulosa tiene estructura amorfa, y es por tanto más fácil de degradar. Puesto que la celulosa se encuentra integrada en una matriz compleja de hemicelulosa, pectina y lignina y es el polisacárido más accesible de todos, su degradación representa un paso clave del ciclo del C (Lladó *et al.*, 2017). Los enzimas que catalizan este proceso son endoglucanasas, exocelulasas (celobiohidrolasas) y β -glucosidasas, actuando, respectivamente, sobre la parte interna de la celulosa, sobre los extremos, y sobre la celobiosa generada previamente a consecuencia de la actividad de la celobiohidrolasa. Los detalles sobre el modo de acción de cada uno de los enzimas pueden consultarse en el trabajo de Rytioja y colaboradores (2014). La participación de las bacterias en la descomposición de este polímero es un hecho incuestionable, y aparentemente una propiedad ampliamente distribuida en el dominio Bacteria. Así lo sugieren Berlemont y Martiny (2013), quienes detectaron que aproximadamente un 24% de los genomas secuenciados hasta aquel momento albergaban genes que codifican enzimas implicados en la hidrólisis de celulosa.

Otro constituyente de la lignocelulosa es la hemicelulosa, heteropolímero más versátil que la celulosa en términos de estructura y composición. Existen diferentes tipos de hemicelulosas, encontrándose formadas por polímeros de xilano, manano, galactano o arabinano, y caracterizadas los diferentes grados de ramificación (Beg *et al.*, 2001). Destacan los mananos y los azúcares que los componen (manosa, galactosa y glucosa) por ser los principales constituyentes de la hemicelulosa, si bien su abundancia depende del tipo de material vegetal considerado (Van Dyk y Pletschke, 2012). Las hemicelulosas son más fácilmente degradables que la celulosa, encontrándose implicados en su hidrólisis principalmente diferentes tipos de glicosil hidrolasas como endoxilanasas, xilosidasas, xiloglucanasas, endomananasas, fucosidasas o arabinosidasas, algunas de las cuales participan en la ruptura de las ramificaciones (Rytioja *et al.*, 2014). Puesto que las hemicelulosas son polímeros muy diversos, las bacterias que sintetizan los distintos enzimas que las degradan desempeñan también un importante papel en el reciclado de nutrientes en el suelo, como se detallará más adelante.

La lignina es el constituyente fenólico de la lignocelulosa, el cual aporta rigidez y cierta impermeabilidad a la pared celular vegetal, confiriendo por tanto un efecto protector a las mismas frente al ataque de organismos patógenos (Van Dyk y Pletschke, 2012). Así, se trata del componente lignocelulósico más resistente a la degradación bacteriana, si bien diversos estudios demuestran la existencia de bacterias capaces de degradar este compuesto fenólico. Entre las bacterias ligninolíticas se identifican diversos géneros como *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Ochrobactrium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penibacillus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Microbacterium*, y

Streptomyces, entre otros (Bandounas *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2014). Las bacterias son capaces de degradar la lignina gracias a la actividad del enzima lacasa y peroxidasas ligninolíticas, aunque la eficiencia de las bacterias en este proceso se considera muy inferior a la reportada para los hongos (Větrovský *et al.*, 2014). Sin embargo, la resistencia y el alto contenido en lignina de las plantas más adultas y más leñosas, hacen que las bacterias que participan en la descomposición de este compuesto fenólico sean piezas clave para completar el ciclo del C.

2.2.2.1.1.2. Descomposición del micelio fúngico

Los hongos representan una importante fracción de la biomasa microbiana total presente en la hojarasca y el suelo de los bosques, siendo por tanto el micelio fúngico un importante reservorio de materia orgánica (Baldrian *et al.*, 2013). La pared celular fúngica se encuentra compuesta fundamentalmente por polisacáridos, siendo el resto de componentes lípidos y proteínas. En ocasiones también pueden estar presentes pigmentos de naturaleza fenólica como melanina, o bien polifosfatos o iones inorgánicos (Bartnicki-Garcia, 1968). Entre los polisacáridos destaca principalmente la quitina (polímero formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina), pudiéndose detectar también varios tipos de glucanos, glucomananos y otros polisacáridos que contienen galactosa, galactosamina, fucosa y otros componentes. Sin embargo, la cantidad de cada uno de ellos puede variar enormemente entre organismos (Bartnicki-Garcia, 1968).

La biomasa fúngica es más fácilmente degradable que la lignocelulosa, si bien la presencia de melanina en la pared celular fúngica puede dificultar el proceso degradativo (Fernandez y Koide, 2014). En cualquier caso, la descomposición de la biomasa fúngica es mediada por hongos y bacterias, siendo la contribución de estas últimas mayor que la documentada para los hongos (Brabcová *et al.*, 2016). En el caso particular de la quitina se ha demostrado que en el suelo, la tasa de hidrólisis de este polímero nitrogenado se encuentra correlacionada con la abundancia bacteriana, sugiriendo así la importancia de estos microorganismos en la degradación del polímero (Kielak *et al.*, 2013).

La degradación bacteriana de la quitina es llevada a cabo por glicosil hidrolasas como las quitinasas (endoenzimas que hidrolizan los enlaces (1→4)-β-D-glicosídicos de forma aleatoria), o β-N-acetil-hexosaminidasas, enzimas que actúan sobre los extremos no reductores de los productos generados por las quitinasas (Beier y Bertilsson, 2013). Así, el proceso mediado por las quitinasas es conocido como *quitinolisis*. Sin embargo, este polímero puede ser transformado sin que tenga lugar su disolución completa, dando lugar a la formación de moléculas más sencillas (N-acetilglucosamina, glucosamina, acetato o glucosa) que pueden ser directamente incorporadas a la biomasa bacteriana, o bien mineralizadas. Cabe destacar que tanto la quitinolisis como la transformación del polímero son llevadas a cabo fundamentalmente por bacterias, quedando de nuevo patente su importante papel en el ciclo del C y también del N (Beier y Bertilsson, 2013).

Los genes que codifican ambos enzimas quitinolíticos se encuentran distribuidos en los genomas de bacterias taxonómicamente divergentes, entre los que destacan aquellos pertenecientes a los géneros *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Actinomyces*, *Vibrio*, *Serratia* entre otros adscritos a los *phyla* *Proteobacteria* y *Firmicutes*, y especialmente *Actinobacteria* (Berlemont y Martiny, 2013).

No debe olvidarse que los procesos de descomposición de la biomasa vegetal y fúngica mediados por bacterias de ecosistemas como los forestales suponen también la degradación de biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, contribuyendo también así con los ciclos del P y N.

2.2.2.1.1.3. Metabolización de los exudados radiculares

Si bien los procesos anteriormente señalados ocurren principalmente en el suelo o la hojarasca, la rizosfera es considerada un punto caliente de gran relevancia en cuanto al flujo de C en los ecosistemas forestales. Se estima que hasta un 40% del C recién fijado mediante la fotosíntesis se transloca al suelo a través de las raíces, donde es asimilado o transformado nuevamente a CO₂ mediante la respiración bacteriana (Kuzyakov y Cheng, 2001). Además de la rizosfera, la micorrizosfera (zona de la raíz influida por la simbiosis micorrícica) cobra un especial interés dada la dominancia de los hongos ectomicorrícicos en los ecosistemas forestales, y la consecuente área de extensión de las ectomicorrizas. De forma similar a lo que sucede con las raíces, los hongos ectomicorrícicos excretan compuestos de bajo peso molecular que pueden ser utilizados para el desarrollo bacteriano, lo cual hace que la micorrizosfera sea considerada también como una zona de abundancia de nutrientes para las bacterias y otros microorganismos (Uroz *et al.*, 2013).

2.2.2.1.1.4. Otros procesos

En los suelos forestales las bacterias participan en el ciclo del C no solo mediante descomposición de la materia orgánica, sino también a través de otros procesos. Las bacterias metanotrofas son capaces de oxidar el metano en condiciones aeróbicas, encontrándose este tipo de metabolismo metilotrófico adscrito principalmente a los *phyla Proteobacteria* (especialmente a las clases *Alpha-* y *Gammaproteobacteria*) y *Verrucomicrobia* (acidófilas) (Ho *et al.*, 2013).

Inversamente, la fijación de CO₂ mediada por bacterias autótrofas supone una entrada de C en los ecosistemas forestales. Así, se ha demostrado que bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* (frecuentemente detectado en los suelos forestales), poseen genes en su genoma relacionados con los procesos fotosintéticos (Okubo *et al.*, 2012), siendo conocido también el papel fotosintético del *phylum Cyanobacteria*. Sin embargo, debe remarcarse que la entrada de C en los suelos forestales mediante fijación de CO₂ resulta simbólica (Žifčáková *et al.*, 2016).

2.2.2.1.2. Contribución bacteriana al ciclo del N

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la degradación del micelio fúngico es una de las principales entradas de N al correspondiente ciclo. Adicionalmente, las bacterias son capaces de obtener N a partir de una amplia variedad de compuestos orgánicos presentes en los suelos de los bosques, principalmente proteínas y aminoácidos (Lladó *et al.*, 2017), así como a través de la fijación de N₂ atmosférico.

Sin embargo, en los ecosistemas forestales las bacterias se encuentran igualmente implicadas en el recambio del N mineral. Así, en los bosques destacan los procesos de nitrificación y desnitrificación, principalmente. La oxidación de amonio hacia nitrato, conocida como nitrificación, es un proceso gobernado por bacterias y arqueas

que implica múltiples enzimas. Entre los procariotas oxidadores de amonio destacan las bacterias, concretamente los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* y *Nitrospira*, siendo este último el más abundante en suelos ácidos de bosques con bajo contenido en amonio. Por otro lado, la desnitrificación o reducción desasimilatoria de nitrato – proceso mediante el cual se generan compuestos gaseosos de N (NO, N₂O o N₂) a partir de la reducción de nitrito o nitrato – es también frecuente en los suelos de los bosques. Dicha desnitrificación es llevada a cabo por bacterias que pertenecen a los *phyla* *Acidobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*, entre otros, y que se encuentran ampliamente distribuidos en los suelos forestales (Lladó *et al.*, 2017).

2.2.2.1.3. Contribución bacteriana al ciclo del fósforo

La materia orgánica constituye una importante fuente de fósforo inmovilizado en los ecosistemas forestales, siendo ejemplos de ello el inositol fosfato (fitato) presente en las semillas, o los fosfo(mono-, di-, tri-)ésteres típicos de la biomoléculas (Glick, 2012). Las bacterias son capaces de mediar la mineralización de fosfato orgánico mediante la síntesis y actividad de diferentes enzimas. Por un lado son conocidas las fosfomonoesterasas o fosfatasas, la cuales catalizan la hidrólisis de ésteres o anhídridos de ácido fosfórico, siendo clasificadas en ácidas o alcalinas según su pH óptimo (Nannipieri *et al.*, 2011). Por otro lado, el P contenido en el fitato puede ser liberado gracias a la actividad de fitasas, mientras que las fosfonatasas y las liasas C-P son aquellas implicadas en la ruptura de los enlaces C-P de los organofosfonatos (Rodríguez *et al.*, 2006).

En tanto, la solubilización bacteriana del fósforo mineral constituye una de las principales formas de contribución al ciclo de este elemento, la cual es descrita en mayor detalle más adelante (Apartado 2.2.2.2.1.1.2.).

Así, en suelos forestales de naturaleza ácida se ha demostrado que los principales órdenes bacterianos involucrados en la movilización del P son *Rhizobiales*, *Actinomycetales*, *Acidobacteriales* y *Solibacterales* (Bergkemper *et al.*, 2016).

2.2.2.2. PGPB: mecanismos implicados en la promoción del crecimiento vegetal

A pesar de que un amplio rango de bacterias filogenéticamente divergentes puede considerarse PGPB y su modo de vida o nicho ecológico que habitan (endosfera radicular o rizosfera) puede ser radicalmente diferente, todas ellas ejercen un efecto positivo sobre los hospedadores vegetales mediante los mismos modos de actuación (Santoyo *et al.*, 2016). De forma generalizada se ha establecido que las PGPB pueden actuar de forma directa sobre las plantas facilitando o mejorando la adquisición de macro- y micronutrientes, y modulando el crecimiento vegetal. La supresión o disminución del efecto perjudicial ocasionado por organismos fitopatógenos (hongos, oomicetos, nematodos, insectos), por contra, se considera un modo indirecto de actuación. No debe olvidarse que algunos de los procesos abordados anteriormente (Apartado 2.2.2.) contribuyen en última instancia a la mejora de la salud de la planta, por ejemplo, la mineralización del P orgánico.

2.2.2.2.1. Mecanismos directos

2.2.2.2.1.1. Mejora de la biodisponibilidad de nutrientes

Una gran diversidad de leguminosas tanto herbáceas como arbustivas (*Vicia lathyroides*, *Genista versicolor*, *Ulex parviflorus*, *Adenocarpus decorticans*, entre otras) forman parte del paisaje típico de los bosques mediterráneos de montaña, al menos en el Espacio Natural de Sierra Nevada (Fernández González, 2014). Su potencial relación simbiótica con bacterias capaces de fijar N_2 atmosférico supone una importante entrada de N asimilable en este tipo de ecosistemas. Por otro lado, los bosques se caracterizan por ser importantes reservorios de elementos inorgánicos atrapados en los minerales del suelo, y que por ende no son fácilmente accesibles para las raíces de los árboles y resto de plantas. En algunos tipos de bosque como los de naturaleza ácida, donde la entrada de enmiendas externas no ha sido intensiva, los minerales constituyen la principal fuente para la nutrición vegetal. Así pues, especialmente en estos ecosistemas la erosión de los minerales es un proceso clave en la nutrición de las plantas (Uroz *et al.*, 2009). Algunas especies arbóreas son capaces de acidificar el suelo rizosférico logrando la liberación de nutrientes a partir de las partículas minerales, sin embargo este no es el caso de las quercíneas (Augusto *et al.*, 1998). Es por ello, que el papel que desempeñan las bacterias en este tipo de procesos se considera de suma relevancia en los mencionados ecosistemas.

2.2.2.2.1.1.1. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es el principal macronutriente esencial de las plantas, ya que forma parte de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos o pigmentos fotosintéticos como la clorofila (Sadava *et al.*, 2009). De toda la biosfera, la atmósfera es el principal reservorio de este elemento, sin embargo, a pesar de su abundancia, el N_2 no puede ser directamente adquirido y metabolizado por las plantas, convirtiéndose por tanto en el principal nutriente limitante de la nutrición vegetal. Para que las plantas no muestren carencias nutricionales por falta de N, el N_2 debe ser reducido a amonio. Dicho proceso es llevado a cabo exclusivamente por organismos procariotas denominados *diazotrofos*, conociéndose este como *fijación biológica de nitrógeno* y encontrándose mediado por el enzima nitrogenasa.

Existe una gran diversidad taxonómica de organismos procariotas que son capaces de fijar el N_2 atmosférico, y estos son clasificados en dos categorías en función de su capacidad o incapacidad de formar estructuras de tipo nodular. Los diazotrofos que no forman nódulos pueden encontrarse en vida libre sin interaccionar físicamente con las raíces de las plantas, sino habitando zonas del suelo próximas a las raíces de tal forma que el N_2 fijado pueda ser fácilmente absorbido por las plantas (Tabassum *et al.*, 2017). Entre este tipo de organismos fijadores en vida libre se encuentran algunos procariotas anaerobios como los pertenecientes a los géneros *Clostridium* o *Desulfovibrio* y algunas arqueas metanógenas. También se conocen bacterias anaerobias facultativas (*Klebsiella* spp. y ciertas especies del género *Bacillus*), así como aerobias, véase algunos géneros como *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Beijerinckia*. A su vez, ciertas bacterias fotosintéticas aerobias (*Anabaena cylindrica* y *Nostoc commune*) y anaerobias (*Rhodospirillum* spp. y *Chlorobium* spp.) contribuyen a la reducción del N_2 en vida libre (Franche *et al.*, 2009).

Algunos endófitos son capaces de fijar N_2 de forma intercelular pero sin necesidad de formar nódulos en las raíces de los hospedadores. Este es el caso de algunas especies de los géneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhanelia*, y *Rhizobium*, entre otros (Franche *et al.*, 2009; Montañez *et al.*, 2009).

Otro tipo de bacterias capaces de reducir el nitrógeno atmosférico son aquellas que forman nódulos en las raíces de sus hospedadores, en cuyo interior tiene lugar el proceso diazotrófico. La formación de este tipo de estructuras ha sido observada para árboles y arbustos de más de 200 especies distintas distribuidas mundialmente. Las bacterias responsables de este fenómeno pertenecen al género *Frankia* del *phylum Actinobacteria*, por lo que este tipo de simbiosis – que supone un importante aporte de N en ecosistemas forestales – es conocida como *actinorrónica* (Velázquez *et al.*, 2010).

Sin embargo, el proceso de fijación de N_2 cuantitativamente más relevante es el que tiene lugar en el interior de los nódulos radiculares formados en las raíces de plantas leguminosas (Velázquez *et al.*, 2010). A las bacterias que llevan a cabo este proceso tradicionalmente se les ha denominado *rizobios*, siendo bacterias pertenecientes al *phylum Proteobacteria*, concretamente a la clase *Alphaproteobacteria*. Sin embargo, la fijación simbiótica de N_2 atmosférico en el interior de nódulos radiculares no se encuentra restringida exclusivamente a géneros adscritos a dicha clase sino que varias especies de los géneros *Burkholderia* o *Cupriavidus* (clase *Betaproteobacteria*) son capaces de llevar a cabo este proceso (Velázquez *et al.*, 2010).

Atendiendo al modelo clásico rizobio-leguminosa, la fijación de N_2 en el interior de los nódulos se considera un proceso complejo que se sucede en múltiples etapas. En síntesis, es primordial que inicialmente tenga lugar un intercambio de señales químicas entre los rizobios y las leguminosas para que estos sean mutuamente reconocidos y se produzca consecuentemente la atracción y posterior adhesión de los rizobios a las raíces. Una vez adheridos tiene lugar el inicio de la organogénesis de los nódulos induciéndose cambios estructurales en la raíz que conducen a la penetración bacteriana en el interior de las mismas. Los rizobios acceden hasta las células del córtex de la raíz donde tras multiplicarse y formar los nódulos tiene lugar su diferenciación en *bacteroides*, estructuras bacterianas especializadas. Rodeados los bacteroides por una membrana que los aísla, se crean las unidades simbióticas mínimas o *simbiosomas*. Así, en condiciones de microanaerobiosis tiene lugar la fijación del N_2 atmosférico mediada por la nitrogenasa bacteriana. La reducción de N_2 a amonio es un proceso que conlleva un alto coste energético, siendo por lo tanto fundamental que la planta aporte parte de sus fotoasimilados a los bacteroides para que obtengan la energía necesaria para la fijación. En sentido inverso, los rizobios le proporcionan a la leguminosa amonio que será asimilado por estas e incorporado en aminoácidos (Sadava *et al.*, 2009).

2.2.2.2.1.1.2. Solubilización de fosfato

Tras el nitrógeno, el fósforo es el macronutriente más importante de la nutrición vegetal, encontrándose implicado en prácticamente todos los procesos metabólicos principales de las plantas. A pesar de que la cantidad de este elemento en el suelo es generalmente muy elevada, la proporción soluble frecuentemente suele ser considerablemente baja. La gran reactividad del anión fosfato hace que este enseguida

precipite en presencia de cationes como Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Co^{2+} o Zn^{2+} , dando lugar a la formación de especies altamente insolubles. Estas a su vez son difícilmente accesibles para las plantas, pues fundamentalmente son los aniones monobásico (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^{2-}) los que las plantas absorben (Bhattacharyya y Jha 2012). En el suelo, la mayoría del fósforo se encuentra en forma inorgánica y se atribuye a minerales insolubles (e.g., apatita y otras sales de fosfato), muchos de los cuales son formados inmediatamente después de la aplicación de fertilizantes químicos basados en formas de fósforo soluble, en el caso de los agroecosistemas (Glick, 2012). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la materia orgánica presente en el suelo también constituye una importante fuente de fósforo poco soluble (Apartado 2.2.2.1.3.). En cualquier caso, algunos autores estiman que tan solo un 1% del P del suelo es asimilado por las plantas en cada ciclo de crecimiento (Borie y Barea, 1981), quedando por tanto demostrada la baja disponibilidad de este elemento para la absorción por las mismas.

En ecosistemas forestales, la implicación bacteriana en el ciclo biogeoquímico del P dista de ser desdeñable. Mediante diferentes mecanismos las bacterias logran mejorar la solubilidad de los fosfatos y en consecuencia les proporcionan P a las plantas que de otra forma estaría disponible en muy bajas cantidades.

En el caso de la solubilización de P inorgánico, el mecanismo más extendido entre las bacterias del suelo se basa en la producción de ácidos orgánicos (e.g., ácido glucónico, cetoglucónico, cítrico, láctico o málico, entre otros). Como consecuencia de la producción y excreción de los mismos al entorno extracelular, el medio circundante se acidifica, teniendo lugar la quelación del catión unido al fosfato y la consecuente liberación de las formas solubles del mismo (Tabassum *et al.*, 2017). Sin embargo, la solubilización de algunos fosfatos como el cálcico también puede tener lugar en ausencia de ácidos orgánicos, siendo necesaria la liberación de protones durante procesos respiratorios o tras la asimilación de NH_4^+ (Illmer y Schinner, 1995), o incluso teniendo lugar la síntesis bacteriana de HCl , HNO_3 o H_2SO_4 .

Numerosos estudios demuestran la gran diversidad de bacterias capaces de solubilizar fósforo inorgánico en los agroecosistemas, sin embargo, dicha habilidad en bacterias que habitan los bosques no ha sido tan estudiada. Aun así, se conocen géneros como *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, entre otros, aislados de la rizosfera o micorrizosfera de quercíneas capaces de solubilizar fosfato (Calvaruso *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2007; Fernández-González *et al.*, 2017).

2.2.2.2.1.1.3. Movilización de hierro

En la corteza terrestre, el hierro (Fe) es el cuarto elemento químico más abundante, encontrándose implicado en procesos biológicos de gran relevancia tanto enzimáticos (actuando como cofactor) como no enzimáticos (Dimkpa, 2016). A pesar de su elevada abundancia, en ambientes aerobios la forma predominante de este elemento (Fe^{3+}) frecuentemente forma hidróxidos y/u oxihidroxidos altamente insolubles y por tanto poco disponibles para los organismos vivos (Ahemad y Kibret, 2014). Los microorganismos y las plantas requieren considerables cantidades de este elemento para su desarrollo, lo cual puede llegar a suponer un problema en ecosistemas como el rizosférico dada la gran competencia por el hierro entre los diferentes microorganismos.

Para superar dicho obstáculo, muchas PGPB sintetizan sideróforos, esto es, moléculas de bajo peso molecular y de extremada afinidad por Fe^{3+} (Dimkpa, 2016). Estos actúan como agentes quelantes de dicho metal, secuestrándolo de minerales o compuestos orgánicos, especialmente en condiciones de limitación de hierro. Una vez los sideróforos alcanzan la membrana bacteriana, el Fe^{3+} es reducido a la forma biológicamente relevante (Fe^{2+}), siendo este último introducido en el interior celular, y degradado el sideróforo libre (Ahemad y Kibret, 2014 y Dimkpa, 2016). En cuanto a la movilización bacteriana del hierro en pro de las plantas, estas son capaces de asimilar dicho elemento a partir de los sideróforos bacterianos mediante mecanismos cuyo detalle excede los objetivos de esta Tesis Doctoral.

Cabe destacar que estructuralmente existen diferentes tipos de sideróforos bacterianos, pudiéndose clasificar en hidroxamatos, catecolatos, o los de tipo hidroxicarboxilato (Khan *et al.*, 2018). La producción de sideróforos ha sido documentada para multitud de especies e incluso géneros bacterianos que interaccionan con plantas de interés agrícola, sin embargo, esta capacidad ha sido menos estudiada para bacterias que habitan en los ecosistemas forestales. Así, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* son algunos de los géneros frecuentes en el suelo de diferentes bosques y de los que se tiene constancia de su producción de sideróforos (Calvaruso *et al.*, 2007; Uroz *et al.*, 2007; Fernández-González *et al.*, 2017).

2.2.2.2.1.1.4. Solubilización de potasio

El potasio (K) es el tercer macronutriente esencial para las plantas. Este participa en procesos vegetales tan relevantes como la regulación del funcionamiento de los estomas o la activación de numerosos enzimas. Su papel en la planta es fundamental ya que el transporte de agua y nutrientes a lo largo del xilema es uno de los procesos en los que este elemento también se encuentra implicado. En el suelo, el K se encuentra fundamentalmente en su forma inorgánica insoluble, formando parte de algunos minerales como las micas (e.g., moscovita, biotita) o los feldespatos (e.g., ortoclasa). Sin embargo, las plantas absorben este elemento fundamentalmente en su forma catiónica, por lo que en muchos suelos la cantidad de potasio fitodisponible se encuentra por debajo de los requerimientos de algunas plantas. Tal y como ocurre con otros elementos químicos, es conocida la existencia de ciertos microorganismos en el suelo capaces de solubilizar la fracción mineral insoluble de K. En este sentido, las bacterias desempeñan un papel central en dicho proceso, siendo capaces de movilizar dicho elemento de sus fuentes minerales mediante reacciones de oxido-reducción en las que interviene la producción de moléculas quelantes, o mediante la producción de ácidos orgánicos (Sattar *et al.*, 2019). Así, se ha demostrado que diferentes especies pertenecientes a los géneros *Acidothiobacillus*, *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* o *Sphingomonas* tienen la habilidad de solubilizar minerales que contienen K, en formas adecuadas para su absorción vegetal.

2.2.2.2.1.2. Modulación del nivel de reguladores del crecimiento vegetal

Algunas bacterias son capaces de producir reguladores del crecimiento de las plantas o modificar el balance hormonal de las mismas, afectando por tanto a diferentes procesos fisiológicos vegetales como el crecimiento, desarrollo radicular o la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés.

2.2.2.2.1.2.1. Síntesis de reguladores del crecimiento vegetal

2.2.2.2.1.2.1.1. Citoquininas y giberelinas

Citoquininas y giberelinas son algunos de los reguladores del crecimiento vegetal que son producidos por diferentes bacterias que interaccionan con las plantas. Las primeras se hallan implicadas en el proceso de división celular, desarrollo radicular, dominancia apical, así como en la regulación de la senescencia de las hojas, siendo la zeatina y la kinetina las más comúnmente producidas por las PGPB (Tabassum *et al.*, 2017). Por otro lado, las giberelinas pertenecen al grupo de reguladores del crecimiento vegetal que participan en procesos relacionados con la germinación de las semillas, elongación del tallo, floración o desarrollo de frutos (Saleem *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado que la inoculación de diferentes tipos de plantas con bacterias capaces de producir uno, otro o ambos reguladores conlleva en última instancia una mejora del crecimiento vegetal. Los fenotipos observados incluyen un aumento del peso fresco del tallo y las raíces de plantas de tomate (Joo *et al.*, 2005), o un incremento del número de raíces laterales y superficie radicular, y por tanto una mejor nutrición de la planta (Sokolova *et al.*, 2011). Sin embargo, el papel que estos desempeñan y la regulación de la síntesis bacteriana son, a día de hoy, poco conocidos (Glick, 2012). Igualmente poco conocidas son las bacterias asociadas a las raíces de los árboles, capaces de sintetizar este tipo de fitohormonas.

2.2.2.2.1.2.1.2. IAA, *indole-3-acetic acid* (ácido indol-3-acético)

El ácido indol-3-acético es un regulador del crecimiento vegetal del grupo de las auxinas. Participa en una gran cantidad de procesos relacionados con el crecimiento de las plantas, así como por ejemplo en las respuestas de defensa a condiciones de estrés. Dicha auxina de tipo indólico estimula la división y la diferenciación celular, la germinación de las semillas, promueve el desarrollo del sistema radicular encontrándose implicada en la formación de raíces laterales y adventicias, participa en la mediación de la respuesta de las plantas a la luz o a la gravedad, entre otros procesos (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

La síntesis bacteriana de este tipo de auxina ha sido ampliamente estudiada, conociéndose a día de hoy una multitud de especies adscritas a diferentes géneros (tanto endosféricas como rizosféricas), capaces de producir IAA. Entre estos destacan algunos como *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*, habiéndose aislado bacterias de este último género a partir de la rizosfera de especies leñosas (*Olea europea*, olivo) con capacidad de sintetizar esta

auxina (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a). Generalmente se considera que el IAA producido y excretado por las bacterias puede modular diferentes procesos fisiológicos vegetales debido principalmente a una alteración de los niveles endógenos de esta auxina en las plantas (Glick, 2012). En líneas generales, la inoculación de hospedadores vegetales con bacterias capaces de sintetizar *in vitro* IAA lleva asociada un cambio en la estructura de las raíces. Principalmente tiene lugar un aumento en la cantidad de pelos radicales y raíces laterales formadas, lo cual a su vez supone una mayor superficie del sistema radicular, y por ende que las plantas tengan un mayor acceso a los nutrientes del suelo. La síntesis de IAA además hace que la exudación radicular se vea estimulada, lo cual a su vez supone un incremento de la colonización de las raíces por las PGPB (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

Sin embargo, debe destacarse que el efecto de este regulador sobre la fisiología de las plantas generalmente varía en función de la concentración del mismo. Así, se ha documentado que la inoculación de una cepa de *P. putida* sobre semillas de judía supone la inducción de la formación de raíces considerablemente más largas que las correspondientes a las plantas control, mientras que raíces más cortas fueron obtenidas en el caso de las plantas inoculadas con una cepa sobreproductora de IAA (Xie *et al.*, 1996; Mayak *et al.*, 1999). Además, la respuesta de las plantas al IAA bacteriano puede depender también el tejido en cuestión, así como del estado de desarrollo de la planta (Glick, 2012).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las auxinas desempeñan un papel importante en la fitopatogénesis bacteriana. La aplicación exógena de este tipo de reguladores supone un aumento de la sensibilidad de las plantas a los patógenos, fomentando además la aparición de los síntomas de las enfermedades que causan (Chen *et al.*, 2007). Algunas bacterias fitopatógenas son capaces de producir IAA, posiblemente como parte de una estrategia desarrollada para superar los mecanismos de defensa de los hospedadores (Spaepen y Vanderleyden, 2011). Así pues, organismos fitopatógenos y PGPB comparten algunas habilidades como la síntesis de este tipo de reguladores, sin embargo los mecanismos que subyacen tras el efecto negativo y positivo ejercido sobre los hospedadores, respectivamente, son en la actualidad una incógnita. Todo ello pone de manifiesto la importancia del ácido-3-indolacético como molécula efectora en la interacción planta-microorganismo, tanto en caso de la fitopatogénesis como de la fitoestimulación.

2.2.2.2.1.2.1.3. Otros compuestos

Algunos compuestos volátiles de bajo peso molecular como terpenos o jasmonato y sus derivados son generalmente considerados moléculas de señalización en plantas y otros organismos, sin embargo el papel que desempeñan los compuestos volátiles de síntesis bacteriana en el desarrollo vegetal no ha sido tan estudiado. En el caso de varias cepas de las especies *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Enterobacter cloacae*, se ha demostrado que la producción y emisión de acetoina y el 2,3-butanodiol puede desencadenar la mejora del crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Ryu *et al.*, 2003). Sin embargo, en la actualidad poco se conoce sobre la síntesis de dichos compuestos volátiles en el caso de bacterias que habitan la rizo- o endosfera de especies leñosas.

2.2.2.2.1.2.2. Modulación de los niveles de etileno en la planta

El etileno es un regulador del crecimiento vegetal capaz de afectar el crecimiento de las plantas de múltiples maneras. A la concentración óptima dicho compuesto es capaz de mediar algunos procesos como la maduración de los frutos, la ruptura de la dormancia, la germinación de las semillas, la abscisión de las hojas, activar la síntesis de otras fitohormonas, así como de mediar la respuesta a diferentes tipos de estrés o participar en la formación de raíces secundarias y raíces adventicias (Abeles *et al.*, 1992). Sin embargo, en respuesta a diferentes tipos de estrés (tanto bióticos como abióticos), las plantas son capaces de modular los niveles de hormonas como el etileno. Este, por ejemplo, induce la síntesis de proteínas necesarias para la protección de la planta frente a los efectos negativos asociados a dichas condiciones de estrés. En cambio, cuando el etileno es producido a concentraciones elevadas, se convierte en *etileno de estrés*, induciendo entonces la defoliación, inhibiendo la elongación de las raíces y la formación de nódulos en las raíces de plantas leguminosas, regulando el tipo de nódulo que se forma (Fernández-López *et al.*, 1998), participando en la senescencia y abscisión de las hojas o en la destrucción de la clorofila (Singh *et al.*, 2015).

Algunas bacterias asociadas a las raíces de las plantas son capaces de reducir los efectos del *etileno de estrés*. Dichas bacterias degradan el precursor inmediato del etileno, esto es, ACC (*1-aminocyclopropane-1-carboxylate* o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) gracias a la actividad del enzima ACC deaminasa. Dicho enzima actúa sobre el ACC produciendo amonio y α -cetobutirato, reduciendo en consecuencia los niveles de etileno en la planta. Por consiguiente, las PGPB que sintetizan el mencionado enzima son capaces de reducir el efecto inhibitorio que grandes cantidades de etileno – producidas a raíz de situaciones de estrés – ejercen sobre el crecimiento vegetal (Glick, 2014).

2.2.2.2.2. Mecanismos indirectos

La mejora del crecimiento de las plantas puede ser lograda también como consecuencia de la actividad antagónica de las PGPB sobre organismos patógenos que afectan a la salud de los hospedadores vegetales. Así, algunas bacterias tienen capacidad de inhibir el crecimiento de organismos patógenos (hongos, oomicetos, nematodos, insectos), pudiendo suprimir o reducir la enfermedad ocasionada por estos en la planta hospedadora. En este contexto se define el concepto *control biológico* como “el control o la supresión de las enfermedades que afectan a las plantas debido a una reducción en el número y la actividad de un organismo fitopatógeno mediante el uso de uno o varios organismos, o mediante el uso de un producto resultante de un proceso biológico” (Sindhu *et al.*, 2001). A las bacterias con dichas capacidades positivas se les denomina agentes de control biológico o BCAs (*Biological Control Agents*), siendo capaces de ejercer su efecto protector mediante las estrategias expuestas a continuación.

2.2.2.2.1. Metabolitos secundarios con actividad antagónica

La producción de metabolitos secundarios como antibióticos, biosurfactantes, bacteriocinas o toxinas es uno de los principales mecanismos vinculados al control biológico de organismos patógenos (Sindhu *et al.*, 2001). Si bien una amplia diversidad de bacterias asociadas a las raíces son capaces de producir este tipo de compuestos, los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces* son algunos de los más estudiados por su amplio espectro de moléculas producidas con efecto antibiótico, e.g., anfisina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG, 2,3-diacetylphloroglucinol), pirrolnitrina, HCN, oomicina A, fenazina, tensina, pioluterina, tropolona, oligomicina A, kanosamina, zwittermicina A o xanthobaccina, entre muchas otras (Keel *et al.*, 1992; Milner *et al.*, 1996; Laville *et al.*, 1998; Hashidoko *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 1999; Nowak-Thompson *et al.*, 1999; Dikin *et al.*, 2007; Mavrodi *et al.*, 2013). Debe destacarse que mientras algunas bacterias solo son capaces de producir un único tipo de sustancia, otras por contra sintetizan y excretan múltiples compuestos.

Los mecanismos de actuación de los metabolitos antimicrobianos son también muy diversos, existiendo algunos como las fenacinas o la pirrolnitrina que actúan sobre la cadena de transporte electrónico fúngica (Tripathi y Gottlieb, 1969), otros que afectan negativamente a la citocromo C oxidasa (HCN) (Blumer y Haas, 2000) y algunos que comprometen la integridad de la membrana plasmática de zoosporas, véase DAPG y algunos biosurfactantes (Stanghellini y Miller, 1997). Debe puntualizarse que la revisión de los aspectos relativos a los compuestos con efecto antagónico merece una mención extensa y aparte, dada la gran diversidad de taxones que muestran habilidad para sintetizar estos metabolitos secundarios, la inmensa diversidad de compuestos producidos, así como los diversos modos de acción de estas sustancias.

2.2.2.2.2. Enzimas líticos

Otra estrategia de gran relevancia ecológica seguida por una gran variedad de bacterias que se asocian a las raíces es la síntesis de enzimas extracelulares con actividad lítica. Tal y como se ha mencionado anteriormente (Apartado 2.2.2.1.1.2.), en los suelos forestales las bacterias desempeñan un importante papel en la descomposición del micelio fúngico muerto gracias a la producción de diversos enzimas como quitinasas fundamentalmente, así como otras glicosil hidrolasas, proteasas y lipasas. La producción de este tipo de enzimas extracelulares ha sido igualmente documentada para bacterias que son capaces de inhibir el crecimiento de hongos y oomicetos, suponiendo por tanto una estrategia igualmente válida para la degradación de la pared celular de organismos tanto vivos como ya muertos.

Cabe destacar que la síntesis de enzimas líticos puede considerarse simultáneamente como un mecanismo de parasitismo. Algunos autores sugieren que la colonización bacteriana de las hifas fúngicas y la posterior síntesis de enzimas líticos podría suponer un mecanismo de biocontrol. Así, las cepas *Pseudomonas fluorescens* WCS365 y *P. chlororaphis* PCL1391 capaces de controlar el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* causante de la podredumbre de las raíces de tomate, son capaces de colonizar las hifas del hongo activamente (Bolwerk *et al.*, 2003),

sugiriendo los autores que la colonización podría ser el paso previo a la producción de enzimas extracelulares con los que antagonizar dicho patógeno.

2.2.2.2.3. Degradación de toxinas o factores de virulencia

Un mecanismo implicado en el biocontrol de ciertos microorganismos fitopatógenos es la degradación de toxinas o factores de virulencia producidos por los mismos.

La bacteria *Xanthomonas albilineans* produce el factor de virulencia albicidina, encontrándose este patógeno implicado en la escaldadura foliar de la caña de azúcar (Zhang y Birch, 1997). Sin embargo, algunas especies como *Klebsiella oxytoca* (Walker *et al.*, 1988) y *Alcaligenes denitrificans* (Basnayake y Birch, 1995) son capaces de producir una proteína que se une a dicha toxina y la inactiva, si bien otras como *Pantoea dispersa* son capaces de detoxificar la albicidina gracias a la actividad de una esterasa (Zhang y Birch, 1997).

Por otro lado, diferentes especies fúngicas del género *Fusarium* producen ácido fusárico (ácido 5,2-butilpiridin-2-carboxílico), compuesto implicado en el marchitamiento y podredumbre de una amplia variedad de cultivos (Pegg, 1981). Mediante mecanismos aún no conocidos, la cepa *Burkholderia ambifaria* T16 es capaz de degradar dicha micotoxina en plántulas de cebada e incluso de inhibir el crecimiento de diversas especies del género *Fusarium*, pudiendo ser la degradación del ácido fusárico uno de los mecanismos antagonísticos de dichos hongos fitopatógenos (Simonetti *et al.*, 2018).

Otros hongos como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea* o el oomiceto *Phytophthora infestans* producen ácido oxálico como factor de virulencia, favoreciendo la desestructuración de la pared celular vegetal e inhibiendo la respuesta defensiva de los hospedadores vegetales (Cessna *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando plantas de *Arabidopsis thaliana*, pepino, tomate o incluso vid son inoculadas con una cepa degradadora de ácido oxálico de la especie *Cupriavidus campinensis*, estas se muestran protegidas frente a *B. cinerea* (Schoonbeek *et al.*, 2007).

2.2.2.2.4. Mecanismos de competición

2.2.2.2.4.1. Competición por nutrientes

La rizosfera es un ambiente rico en nutrientes, sin embargo, algunos de ellos resultan limitantes para el crecimiento bacteriano. Así, en este ecosistema muchos microorganismos compiten por nutrientes esenciales de baja biodisponibilidad como el Fe (Apartado 2.2.2.2.1.1.3.). Generalmente se estima que las bacterias requieren una concentración aproximada de este elemento de 10^{-6} M para su correcto desarrollo, siendo la concentración de la forma soluble del hierro en muchos suelos dos órdenes de magnitud inferior (Shindu *et al.*, 2009 y Tabassum *et al.*, 2017). Para superar dicha limitación, las bacterias sintetizan sideróforos tal y como se ha mencionado anteriormente, los cuales destacan por su mayor afinidad por el hierro en comparación con los de origen fúngico. De esta manera, el secuestro del hierro mediado por los sideróforos bacterianos hace que este elemento se encuentre menos disponible para algunos hongos fitopatógenos, viéndose así limitada su capacidad de proliferación en la

rizosfera (O'Sullivan y O'Gara, 1992). Debe mencionarse que en este contexto, generalmente el crecimiento de la planta no se ve afectado por una disminución del nivel de hierro causada por los sideróforos bacterianos, dado que las plantas son capaces de crecer a concentraciones de hierro inferiores que los microorganismos (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

2.2.2.2.4.2. Competición por el nicho ecológico

Además de la producción de sideróforos, muchos BCAs se distinguen por sus rápidos movimientos quimiotácticos sobre la superficie de las raíces en crecimiento hacia los nutrientes procedentes de los exudados radiculares. Dichas bacterias son capaces de colonizar rápida e intensamente las raíces y utilizar los nutrientes allí disponibles, siendo por tanto muy difícil la supervivencia de otros microorganismos en dicho nicho ecológico que no tengan tales capacidades (Glick, 2012). Así, aspectos como el movimiento flagelar, la quimiotaxis, la adhesión a la superficie de las raíces mediada por el O-antígeno o fimbrias, entre otros, son clave para la colonización y la subsecuente ocupación de nichos como la raíz de las plantas (Prashar *et al.*, 2013).

2.2.2.2.5. Inducción de la resistencia sistémica

Se conoce como resistencia sistémica inducida (ISR, *Induced Systemic Resistance*) al estado de resistencia de las plantas frente a organismos fitopatógenos desencadenado por estímulos bióticos o abióticos específicos. Entre los desencadenantes de origen biótico se encuentran tanto estructuras bacterianas (flagelo, lipopolisacárido) como diferentes metabolitos sintetizados por bacterias, sideróforos, compuestos orgánicos volátiles, metabolitos con actividad antimicrobiana de diversa índole, o ácido salicílico (van Loon *et al.*, 1998). En respuesta a dichos estímulos, se activa la expresión en las plantas de genes implicados en la defensa de las mismas frente a organismos patógenos, sin que tenga necesariamente que ocurrir una infección localizada por uno de ellos. La ISR permite que estas respondan a un diverso rango de patógenos gracias a cambios estructurales, fisiológicos y metabólicos. Entre ellos destaca el engrosamiento de la pared celular vegetal, la producción de metabolitos de defensa, la acumulación de proteínas y enzimas de defensa (proteínas PR, quitinasas, catalasa, fitoalexinas, polifenol oxidasa, etc.). Cabe destacar que la inducción de este tipo de respuesta defensiva no causa síntomas visibles en la planta hospedadora (Glick, 2012).

Así, diversos estudios han demostrado que algunas bacterias podrían ser empleadas como BCAs ya que pueden actuar como elicitores de la ISR, resultando en la protección de las plantas frente a diferentes tipos de patógenos, incluyendo hongos, otras bacterias, virus, insectos y nematodos (Sikora, 1988; Maurhofer *et al.*, 1998). Existen evidencias de este mecanismo de biocontrol tanto en plantas agrícolas como forestales, destacando la protección de *Quercus virginiana* frente al hongo *Ceratocystis fagacearum* al ser pre-inoculado con una cepa endófito de la especie *P. putida* (Brooks *et al.*, 1994).

Debe tenerse en consideración que en la mayoría de los casos las PGPB y los BCAs son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante varios de los mecanismos mencionados. Por otro lado, el efecto que una bacteria ejerce sobre una planta puede variar conforme se producen cambios en las condiciones ambientales o los parámetros fisiológicos vegetales. Por ejemplo, en una situación de limitación de algunos nutrientes como N o P, las PGPB pueden proporcionarles a las plantas dichos elementos mediante los mecanismos aquí resumidos. Sin embargo, este fenómeno puede verse limitado o incluso cesado si se aplican externamente cantidades significativas de fertilizantes (Glick, 2012).

2.2.2.3. Bioformulaciones basadas en PGPB y/o BCAs

En el ámbito agrícola, el interés por el uso de biofertilizantes y biopesticidas ha crecido exponencialmente en las últimas décadas. El progresivo descubrimiento de los mecanismos implicados en la promoción del crecimiento vegetal (tanto directos como indirectos) así como de sus múltiples beneficios sobre las plantas, ha hecho que este tipo de bacterias se muestre como una herramienta con gran potencial en la agricultura. Históricamente los agricultores han empleado fertilizantes, pesticidas e insecticidas químicos con los que mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos, así como para controlar las enfermedades y plagas que causan importantes pérdidas económicas anuales (Tabassum *et al.*, 2017). Sin embargo, son bien conocidas las consecuencias perjudiciales para el medioambiente del uso extendido e intensivo de este tipo de compuestos químicos. Así, la inoculación de las plantas de interés agrícola con PGPB y/o BCAs autóctonos (aquellos aislados de los propios tejidos de la planta en la que posteriormente serán aplicados, o del ecosistema inmediato en el que habitan dichos hospedadores) se ha mostrado como una alternativa prometedora al uso de agroquímicos, dada su seguridad medioambiental, entre otros aspectos. Tal es así que la cantidad de trabajos que abordan el efecto de la inoculación bacteriana sobre especies agrícolas es innumerable, existiendo además en el mercado cuantiosas bioformulaciones basadas en PGPB y/o BCAs (Tabassum *et al.*, 2017).

Sin embargo, el mayor crecimiento y mejor *fitness* de las plantas también es objeto de estudio en el caso de cultivos arbóreos y en ecosistemas forestales. La producción vegetal en los viveros forestales se encuentra principalmente orientada hacia los programas de repoblación y/o recuperación, si bien parte del material vegetal también se destina hacia el uso particular o doméstico, así como para la exportación. Así, generalmente se ha considerado que gran parte del éxito de las tareas de repoblación radica en la calidad del material vegetal de los viveros, lo cual requiere que los plantones no tengan ningún tipo de carencia nutricional. Por otro lado, debe tenerse en cuenta el impacto sufrido por los mismos cuando son trasplantados a campo, donde deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales que en muchos casos son hostiles. Si bien diferentes factores condicionan la adaptación a la nueva situación, el vigor de la planta y un rápido desarrollo del sistema radicular son cruciales en este punto (Chanway y Holl, 1991). Dado el importante papel de las PGPB, en las últimas décadas se ha planteado la posibilidad de incorporar en los viveros la inoculación de plantones con PGPB como estrategia para la obtención de material vegetal de calidad con el que realizar tareas de repoblación (Chanway, 1997; Karličić *et al.*, 2016).

Al igual que en el ámbito agrícola, la utilización de bioformulaciones basadas en PGPB y/o BCAs se considera una herramienta no muy costosa económicamente, respetuosa con el medioambiente y fácilmente aplicable en los viveros forestales (Chanway, 1997). Algunos autores se muestran firmes defensores de la utilización de BCAs a nivel de vivero, como estrategia de pretratamiento para el control de hongos patógenos que afectan a especies leñosas (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018b). La inoculación de plantones antes de ser transferidos a campo resultaría más rentable en cuestión de tiempo invertido, más económica y sencilla que los tratamientos a gran escala (en campo), según los mencionados autores. En este contexto, aunque las especies arbóreas no han reclamado tanta atención como las plantas agrícolas, ya se dispone de evidencias que demuestran que la inoculación de plantas de interés silvícola puede igualmente tener efectos positivos sobre las mismas. Algunos autores además defienden que la inoculación bacteriana de plantones podría ser una estrategia positiva para afrontar las condiciones extremas a las que se enfrentan tras su trasplante (Chanway, 1997).

Así, en la Tabla 1 se recogen algunas de las evidencias científicas del efecto positivo de las PGPB sobre especies forestales documentadas en el siglo XXI.

Introducción

Tabla 1. Resumen de los trabajos realizados en el siglo XXI en los que se inoculan especies forestales con microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

Inoculante bacteriano ^a	Planta hospedadora	Efecto sobre la planta ^{b,c}	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Pisolithus tintorius</i>	<i>Pinus pinea</i>	Incremento de la superficie de la parte aérea y sistema radicular; Incremento de la longitud de las raíces y del peso seco de la planta	Probanza <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; Combinación de ambas	<i>P. pinea</i>	Incremento de la superficie de la parte aérea, de la altura tallo y del peso seco de la planta	Probanza <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	Incremento de la altura, peso seco del tallo y del diámetro del cuello de raíz	Lucas-García <i>et al.</i> , 2004
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Rhizobium</i> sp.	<i>P. taeda</i> ; <i>P. elliotii</i>	Incremento de la altura del tallo, longitud, peso y área del sistema radicular Algunas cepas disminuyen la longitud del tallo	Enebak, 2005
<i>Pseudomonas fluorescens</i> + <i>Suillus granulatus</i>	<i>P. halepensis</i>	Incremento del número de raíces laterales, de la cantidad de acículas y del peso seco del tallo	Rincón <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus</i> sp.; <i>Curtobacterium</i> sp.; <i>Arthrobacter</i> sp.; <i>Staphylococcus</i> sp.; <i>Burkholderia</i> sp.	<i>P. pinea</i>	Incremento de la altura y del peso seco del tallo; incremento del peso seco y del diámetro del cuello de raíz	Barriuso <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. halepensis</i> ; <i>Q. coccifera</i>	Incremento de la altura y del peso seco	Rincón <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Eucalyptus</i> spp.	Mejora del porcentaje de germinación; Incremento de la altura del tallo y del peso seco de raíces y tallo	Mafia <i>et al.</i> , 2009
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Incremento de la tasa de germinación, de la altura de la planta, del peso seco de parte aérea y raíces	Puente <i>et al.</i> , 2010
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Incremento de la biomasa	Hao <i>et al.</i> , 2012
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Thuja plicata</i>	Incremento biomasa de las raíces	Anand <i>et al.</i> , 2013a
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i>	Disminución de la mortalidad de plántones; Incremento de la concentración de N foliar y de la biomasa de la planta	Anand <i>et al.</i> , 2013b
<i>Azotobacter chroococcum</i> ; <i>Streptomyces</i> sp.	<i>Ulmus pumila</i> ; <i>R. pseudoacacia</i> ; <i>Acer dasycarpum</i>	Incremento de la altura de plántones	Hajnal-Jafari <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>R. pseudoacacia</i> ; <i>P. sylvestris</i>	Incremento de la altura y del diámetro del cuello de la raíz	Karličić <i>et al.</i> , 2015
<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Betula pubescens</i>	Incremento del peso seco de la raíz y tallo	Sousa <i>et al.</i> , 2015

^a En aquellos casos en los que se analizaron varias cepas bacterianas de la misma especie o incluso varias especies del mismo género, se muestran los rangos taxonómicos inmediatamente superiores comunes.

^b En el caso de que se observaran distintos efectos ocasionados por diferentes bacterias o sobre diferentes hospedadores, se indican todos ellos con independencia de la bacteria u hospedador considerado.

^c Por norma general, las comparaciones se refieren a un control no inoculado. Los detalles específicos del diseño experimental pueden consultarse en los trabajos citados.

Tal es el potencial de las PGPB y de los BCAs sobre plantas de interés agrícola y también sobre las de tipo forestal, que en la actualidad se dispone en el mercado de bioformulaciones que pueden resultar efectivas sobre el *fitness* de algunas especies forestales. Concretamente, el producto Sonata™ ASO, el cual incluye esporas de la cepa *Bacillus pumilus* QST 2808 es comercializado al objeto de controlar diversos organismos patógenos, algunos de los cuales afectan a quercíneas (*Armillaria mellea*, *Phytophthora* spp.), tal y como se recoge en la base de datos BPDB (Bio-Pesticides DataBase; Lewis *et al.*, 2016).

A la vista de los diversos efectos positivos ejercidos sobre las distintas especies forestales, la inoculación de las mismas se muestra como una estrategia prometedora. Sin embargo, se trata de un área de conocimiento que aún está por desarrollar, y que presenta múltiples retos. La mayoría de los trabajos han sido llevados a cabo en condiciones controladas, y no demasiados han sido realizados en campo. Tampoco es conocida la persistencia de los inoculantes bacterianos una vez los plantones tratados son transferidos a campo, ni el efecto que dichos inoculantes pueden ejercer sobre las comunidades microbianas nativas. Aspectos, todos ellos, que deberían ser evaluados para poder consolidar las estrategias basadas en PGPB y/o BCAs en el ámbito silvícola.



OBJETIVOS

La imagen muestra parte del singular tronco de un individuo de *Quercus pyrenaica*.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

Los ecosistemas de montaña, y especialmente los bosques mediterráneos, se encuentran profundamente alterados por el cambio global, siendo las principales amenazas a las que se enfrentan el incremento de las temperaturas y la disminución de las precipitaciones, y como consecuencia el aumento de la frecuencia e intensidad de los incendios forestales. Las bacterias son esenciales en el funcionamiento de los bosques gracias al papel que en ellos desempeñan. Su contribución en los ciclos biogeoquímicos de los elementos resulta primordial en el mantenimiento de los ecosistemas forestales, al tiempo que favorecen el aporte de nutrientes a las plantas e incluso las protegen frente a organismos patógenos. La caracterización de las bacterias implicadas en la funcionalidad de estos ecosistemas resulta esencial para el desarrollo de estrategias como la formulación de bioinoculantes que permitan mitigar los efectos del cambio global y la degradación de los bosques mediterráneos. Así pues, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es la caracterización, a diferentes niveles, de bacterias asociadas a la raíz de plantas leguminosas y de la leñosa *Quercus pyrenaica* Willd. (roble melojo) con las que realizar tareas de mantenimiento o mejora de las masas boscosas del Espacio Natural de Sierra Nevada. Para lograr este objetivo general se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Aislamiento, caracterización genotípica e identificación de rizobios noduladores de plantas leguminosas que podrían emplearse como parte del forraje en áreas pasto-cortafuegos.
- Estudio de la diversidad, composición, estructura, y descripción del core-procarioma total y potencialmente activo de la rizosfera de *Quercus pyrenaica* Willd.
- Estudio de las diferencias en la composición, estructura y potencial funcional entre las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de plantones de roble melojo no inoculados e inoculados con un consorcio bacteriano.
- Aislamiento, caracterización genotípica e identificación de bacterias de la endosfera radicular y rizosfera de *Q. pyrenaica*.
- Caracterización enzimática de bacterias asociadas a la raíz de *Q. pyrenaica*, y estudio de la localización extracelular de los enzimas producidos.
- Caracterización de las actividades promotoras del crecimiento vegetal, directas e indirectas, de bacterias asociadas a la raíz de roble melojo.



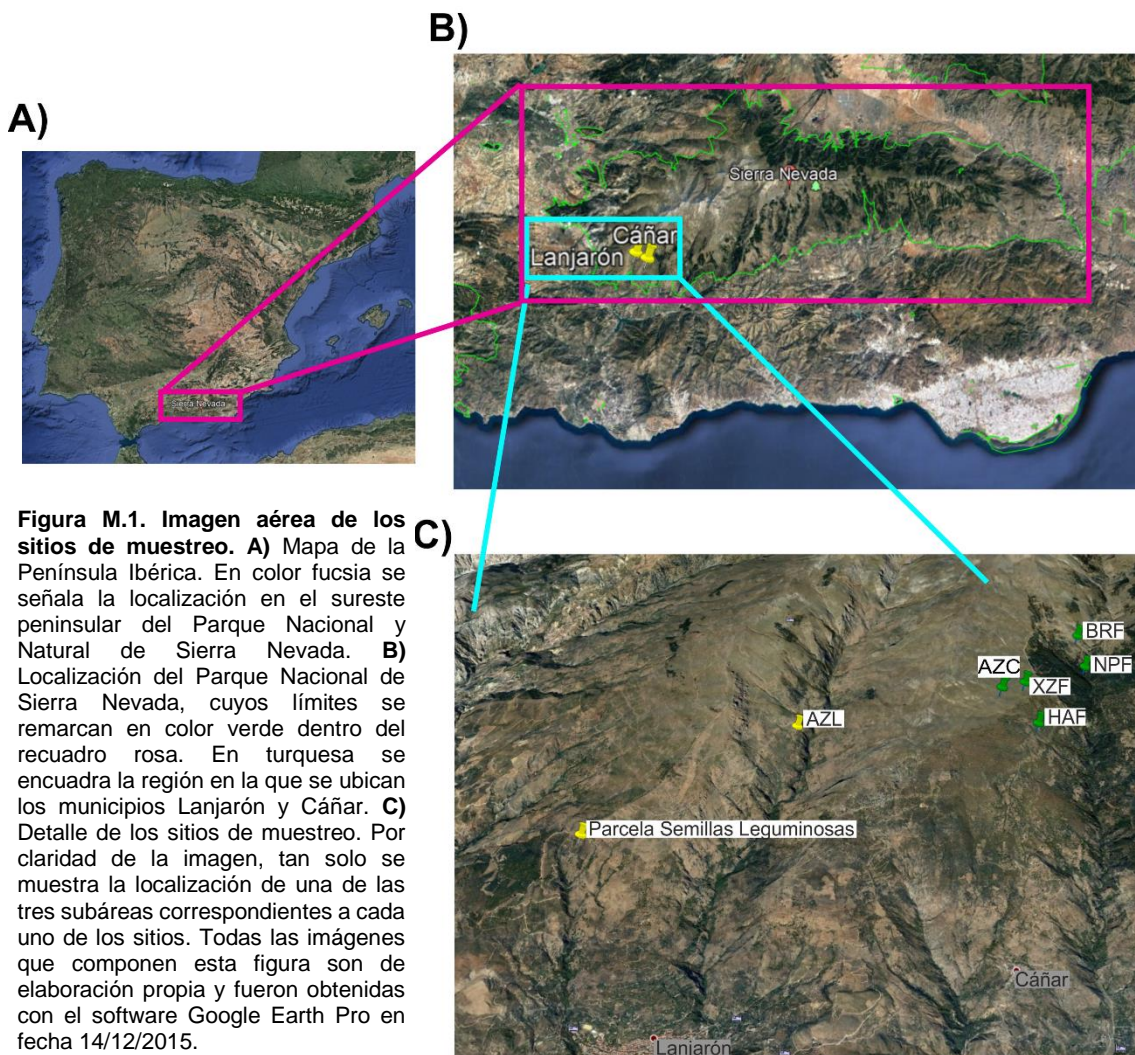
MATERIALES Y MÉTODOS

La imagen muestra el procedimiento para la toma de muestras de suelo rizosférico de *Quercus pyrenaica*.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

M.1. Descripción de las zonas de estudio y demarcación de parcelas

Las zonas estudiadas se encuentran situadas en el sector occidental del Parque Nacional y Natural de Sierra Nevada, en la provincia de Granada, sureste de España. Concretamente, los diferentes puntos de muestreo se localizan en dos áreas montañosas ubicadas en los términos municipales de Cáñar y Lanjarón (Figura M.1). La posición de todos los puntos de muestreo fue registrada con el Sistema de Posicionamiento Global (en inglés, GPS; *Global Positioning System*), y todas ellas se encuentran recogidas en la Tabla M.1.



M.1.1. Término municipal de Cáñar

El área montañosa en estudio se halla en la cara sur de Sierra Nevada, específicamente en la ladera del término municipal de Cáñar, próxima al río Chico. A su vez, en dicha zona se seleccionaron diferentes áreas de muestreo:

- a) **Cáñar alto (HAF, *Highest Altitudinal limit of the Forest*)**: dicho sitio se encuentra ubicado en el límite altitudinal superior en el que de forma natural puede desarrollarse la especie *Q. pyrenaica*. Así pues, este sitio se caracteriza por estar

cubierto por melojares maduros, bien desarrollados, de gran densidad de pies y abundante cobertura vegetal. En los puntos temporales de muestreo (años 2013 y 2015) dichos robledales no mostraban signos de alteraciones, enfermedad, invasión por otras especies leñosas u otros aspectos negativos para las formaciones boscosas de esta especie.

- b) **Cáñar expansión (XZF, eXpansion Zone of the Forest):** a una altitud superior a la que frecuentemente se desarrolla el roble melojo (ver Tabla M.1) se seleccionó una zona históricamente empleada para el cultivo de sorgo (*Sorghum vulgare* L.), hasta que en el año 1965 dicha práctica fue abandonada definitivamente (Dr. Javier Cano-Manuel, comunicación personal). Por ende, en los momentos de muestreo (2013 y 2015) fue posible encontrar en dicha zona pies sueltos de roble melojo, de no más de 50 años de edad, que no constituían una formación boscosa ni tan siquiera abierta⁵. La zona se caracteriza por estar cubierta por un denso piornal dominado por la leguminosa arbustiva *Genista versicolor*, y matorral almohadillado.
- c) **Cáñar fuego (BRF, Burned and Reforested Forest):** se trata de una zona que se encontraba cubierta por un bosque de pino silvestre (*Pinus sylvestris*) el cual fue arrasado por el fuego durante un incendio en el año 1995. Un año después, este área fue reforestada con roble melojo, no superando por tanto la edad de los árboles los 20 años en el momento de muestreo. Así pues, esta zona es considerada como una zona de segunda repoblación⁶, y en el momento de muestreo (años 2013 y 2015) se encontraba cubierta por un pequeño bosque mixto abierto.
- d) **Cáñar Pinar (NPF, Naturalized Pine Forest):** zona históricamente cubierta por formaciones boscosas de roble melojo hasta la década de los 50, momento en el que se deforestó y se repobló con pino silvestre. En primavera del año 2013 se realizó un clareo en el pinar ya consolidado reforestando subsecuentemente con plantones de *Q. pyrenaica* (inoculados y control; Apartado M.8.2.6. y Capítulo III) con el objetivo de naturalizar la zona. Así pues, se trata de una zona de segunda repoblación.
- e) **Cáñar Reforestación (AZC, Afforested Zone in Cáñar):** se trata de una zona muy próxima a XZF (Figura M.1C), la cual se encuentra intensamente cubierta por un piornal dominado por *G. versicolor*. En el año 2013 se llevó a cabo una forestación piloto del área mediante introducción de plantones de roble melojo inoculados y sin inocular (Apartado M.8.2.6. y Capítulo III).

⁵ Considerando el término *formación boscosa abierta* propuesto por la FAO (1998).

⁶ Siguiendo la definición propuesta para el término *segunda repoblación* según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018).

M.1.2. Término municipal de Lanjarón

En el término municipal de Lanjarón, correspondiente a la cara sur de Sierra Nevada, se seleccionaron dos áreas de muestreo:

- a) **Lanjarón Reforestación (AZL, *Afforested Zone in Lanjarón*)**: se trata del área del Cortijo de Tello, ubicada en la ribera del río Lanjarón, la cual sufrió un incendio en septiembre de 2005. Tras el incendio proliferaron abundantes leguminosas arbustivas y germinaron algunas bellotas de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*). En el año 2013 la zona fue forestada con plantones de roble melojo (inoculados y control), pasando a tratarse de una zona de primera repoblación.
- b) **Parcela Semillas Leguminosas (LSP, *Legume Seed Plot*)**: esta parcela se encuentra próxima a Cortijo Quemado, ubicado en el término municipal de Lanjarón. Aquí se muestreó en una parcela experimental próxima a un área pasto-cortafuegos, que fue establecida por el grupo de investigación sobre Pastos y Sistemas Silvopastorales Mediterráneos liderado por el Dr. D. José Luis González-Rebollar para hacer ensayos de vegetación autóctona y su aplicabilidad en prevención de incendios forestales. Dicha zona montañosa se caracteriza por ser rica de forma natural en determinadas especies leguminosas que forman parte del forraje ganadero.

Cabe destacar que en todas las zonas de muestreo (a excepción de LSP), se seleccionaron tres subáreas cuya localización, altitud y características se resumen en la Tabla M.1.

Materiales y Métodos

Tabla M.1. Localización y características principales de las zonas de estudio.

Zona	Sitio de muestreo	Subárea	Coordenadas	Altitud (msnm) ^a	Características principales
Cáñar	HAF	1	N 36° 57' 11.2", W 03° 26' 21.0"	1778	Melojar maduro, establecido, bien desarrollado
		2	N 36° 57' 39.3", W 03° 25' 13.6"	1796	
		3	N 36° 57' 55.9", W 03° 25' 18.4"	1883	
	XZF	1	N 36° 57' 19.5", W 03° 26' 35.0"	1887	Pies aislados de roble melojo (edad inferior a 50 años)
		2	N 36° 57' 52.0", W 03° 25' 49.3"	1972	
		3	N 36° 58' 05.9", W 03° 25' 18.9"	1975	
	BRF	1	N 36° 58' 42.7", W 03° 24' 33.3"	2017	Zona reforestada con pies de roble melojo en 1995 (edad inferior a 20 años)
		2	N 36° 58' 40.3", W 03° 24' 35.4"	2016	
		3	N 36° 58' 41.6", W 03° 24' 39.0"	2052	
	NPF	1	N 36° 58' 23.4", W 03° 24' 36.4"	1887	Pinar naturalizado (año 2013) con plantones de roble melojo inoculados y control
		2	N 36° 58' 22.8", W 03° 24' 44.5"	1917	
		3	N 36° 58' 15.2", W 03° 24' 47.0"	1883	
	AZC	1	N 36° 57' 20.3", W 03° 26' 38.5"	1889	Piñal forestado con plantones de roble melojo inoculados y control (año 2013)
		2	N 36° 57' 38.1", W 03° 26' 15.5"	1944	
		3	N 36° 57' 59.0", W 03° 25' 34.5"	1982	
Lanjarón	AZL	1	N 36° 57' 42.9", W 03° 27' 43.0"	1651	Zona arrasada por un incendio y forestada con plantones de roble melojo inoculados y control (año 2013)
		2	N 36° 57' 36.0", W 03° 27' 46.2"	1610	
		3	N 36° 57' 32.5", W 03° 27' 43.7"	1568	
	LSP		N 36° 56' 38.2", W 03° 29' 43.5"	1320	Zona próxima a un área pasto-cortafuegos, abundantes leguminosas constituyentes del pasto del ganado

^a msnm, metros sobre el nivel del mar

En NPF, AZC y AZL, las correspondientes tres subáreas en estudio fueron cercadas mediante la colocación de alambrado metálico de aproximadamente 2 m de altura. Con ello se pretendió evitar la irrupción de animales – especialmente ungulados y suidos – y proteger de esta manera las zonas en estudio. Así pues, en cada uno de los sitios mencionados se delimitaron tres parcelas de 10 x 10 m.

M.2. Toma de muestras en campo

M.2.1. Muestreo de suelo rizosférico de *Q. pyrenaica*

El diseño experimental del presente estudio supuso la toma de muestras de suelo de la rizosfera de roble melojo en tres momentos diferentes. En la primavera de 2013 se muestrearon exclusivamente los sitios HAF, BRF y XZF, repitiéndose el muestreo de dichos sitios y tomando muestras de NPF, AZC y AZL dos años después durante la misma estación. Cabe destacar que en otoño de 2014 se tomaron muestras de suelo rizosférico exclusivamente de tres árboles de la parcela 1 de HAF.

En cada una de las tres subáreas ubicadas en los sitios mencionados se tomaron muestras del suelo de la rizosfera de tres árboles, obteniéndose por lo tanto nueve muestras de cada uno de los sitios considerados. Los árboles seleccionados se encontraban separados entre sí a una distancia igual o superior a 5 m, siendo el diámetro del tronco a la altura del pecho inferior a 15 cm en el caso de los árboles situados en XZF y BRF, o a 30 cm si estos se hallaban en HAF. Por el contrario, durante el muestreo de 2015 en cada una de las parcelas delimitadas en las zonas NPF, AZC y AZL se seleccionaron aleatoriamente tres árboles inoculados y tres sin inocular de año y medio de edad, y por consiguiente, de menor diámetro de tronco. En todos los casos, la muestra del suelo de la rizosfera de cada uno de los árboles en estudio fue tomada de forma individualizada e independiente. Más adelante se detallan los experimentos de inoculación y siembra en campo de los plantones de roble (Apartado M.8.2.6 y Capítulo III).

La toma de muestras fue realizada siguiendo el procedimiento descrito previamente por Cobo-Díaz y colaboradores (2015). Concretamente, las muestras de suelo rizosférico fueron tomadas a una distancia inferior a 50 cm del tronco. Inicialmente la hojarasca y los primeros 5 cm de profundidad del suelo fueron descartados con el objetivo de eliminar la fracción superficial frecuentemente dominada por hongos así como las raíces de plantas herbáceas. Así pues, a una profundidad de 5-25 cm, se siguieron las raíces principales del árbol hasta hallar raíces laterales jóvenes no suberificadas. Con ayuda de una pala limpia, se tomaron aproximadamente 300 g de suelo influenciado por las raíces, separando estas del propio suelo.

Por un lado, dicha fracción de suelo fue reservada y almacenada a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Una vez allí, las muestras obtenidas de diferentes árboles procedentes de la misma subárea fueron mezcladas obteniéndose así tres muestras compuestas representativas de cada sitio en estudio, de aproximadamente 0.9-1 kg. Posteriormente, dichas muestras compuestas fueron tamizadas haciéndolas pasar a través de tamices de malla de 2 mm de diámetro de poro, con el objetivo de eliminar los agregados de suelo más groseros y restos de material vegetal. Las muestras tamizadas se almacenaron a 4 °C hasta la determinación de los parámetros fisicoquímicos del suelo (Apartado M.3), o bien a -80 °C hasta proceder al aislamiento bacteriano detallado en el Apartado M.6.3.1.

Por otro lado, las raíces recuperadas fueron sacudidas manualmente de forma vigorosa con el objetivo de eliminar las partículas de suelo más groseras. A continuación se aplicó fricción de forma manual sobre las raíces hasta obtener al menos 2 g del suelo

fuertemente adherido a las mismas, el cual, a su vez, fue mezclado con 5 mL de la solución LifeGuard™ Soil Preservation Solution (MoBio Laboratories Inc., EEUU). Pese a que dicha solución permite mantener la viabilidad de las células bacterianas, la estabilidad de los ácidos nucleicos así como los perfiles de expresión y la estructura de la comunidad microbiana, las muestras fueron almacenadas inmediatamente a 4 °C y posteriormente a -20 °C hasta la extracción de ácidos nucleicos, que se realizó en las 48 horas posteriores.

M.2.2. Muestreo de suelo no rizosférico y semillas de plantas leguminosas

En primavera de 2013 se tomaron tres muestras de suelo en el interior de la parcela LSP. En este caso, se retiró la fracción superficial de suelo con el objeto de eliminar gran parte de las herbáceas allí presentes, y con ayuda de una pala limpia se tomaron 30 kg de suelo suelto o no rizosférico. Las muestras fueron mezcladas e inmediatamente conservadas a 4 °C.

A su vez, en la misma zona las Dras. Dña. Ana Belén Robles Cruz y María Eugenia Ramos Font del Servicio de Evaluación, Recuperación y Protección de Agrosistemas Mediterráneos recolectaron, entre otras muchas, semillas de las leguminosas *Lathyrus cicera*, *L. intricatus* (actualmente *L. sphaericus*)⁷, *Vicia sativa* subsp. *angustifolia* (actualmente *V. amphicarpa*), *V. disperma*, *Trifolium cherleri* o *T. glomeratum*.

M.2.3. Muestreo de individuos jóvenes de roble melojo

Durante la primavera de 2015, en cada una de las parcelas delineadas en la zona NPF se descuajaron tres de los robles inoculados que fueron plantados en 2013, así como tres individuos sin inocular. Gracias al uso de palas limpias, los individuos fueron descuajados tratando de conservar la integridad de la mayor parte posible del sistema radicular de cada uno de los robles. Inmediatamente después, los individuos fueron introducidos en bolsas plásticas limpias y almacenados a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

M.3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de la raíz de *Q. pyrenaica*

Los análisis fisicoquímicos de los suelos fueron realizados en el Laboratorio Agroalimentario de Atarfe, Granada (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía) siguiendo métodos estandarizados. En síntesis, la textura de los suelos fue medida mediante el método de Bouyoucos (Bouyoucos, 1962); el pH fue determinado mediante métodos potenciométricos (Willard *et al.*, 1974; Bates, 1983), y el contenido en agua disponible fue medido por gravimetría tras secar las muestras de suelo a 105 °C (Gardner, 1986). La salinidad de los suelos fue determinada indirectamente midiendo la conductividad eléctrica de los mismos, mientras que el fósforo y potasio soluble fueron medidos por el método de Bray (Bray y Kurtz, 1945),

⁷ Puesto que la taxonomía botánica está sometida a incesantes revisiones y cambios (Rapini, 2014), en lo sucesivo se empleará el nombre de las especies válidamente aceptado en el momento de muestreo (año 2013).

cuantificando mediante colorimetría. Para determinar cuantitativamente el contenido en materia orgánica se aplicaron técnicas volumétricas por vía húmeda, basadas en la oxidación de la materia orgánica a temperatura controlada (Mebius, 1960), mientras que el contenido total de nitrógeno fue determinado por el método de Kjeldahl (Bremner, 1965). Finalmente, la relación carbono:nitrógeno (C:N) fue calculada a partir de ambos parámetros, teniendo en cuenta la Ecuación 1.

$$C:N = \frac{\text{Contenido en materia orgánica (\%)}}{1.74 \cdot \text{Contenido total de N (\%)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

M.4. Técnicas de biología molecular

M.4.1. Extracción de ácidos nucleicos

M.4.1.1. Extracción de DNA y RNA de suelo rizosférico

Para obtener los perfiles taxonómicos de la comunidad procariota total y potencialmente activa que habita la rizosfera de *Q. pyrenaica*, el DNA y RNA totales, respectivamente, fueron co-extraídos de forma conjunta a partir de cada una de las muestras de suelo individuales. Así pues, el RNA y DNA rizosféricos fueron extraídos simultáneamente y posteriormente fraccionados empleando los kits RNA Power Soil® Total RNA Isolation Kit y RNA Power Soil® DNA Elution accessory kit MoBio Laboratories Inc., EEUU), respectivamente.

Concretamente, los tubos conteniendo 2 g de suelo rizosférico preservados en 5 mL de la solución LifeGuard™ Soil Preservation Solution (Apartado M.2.1.) fueron centrifugados durante 10 min a 6000 rpm, descartando *a posteriori* la solución. A cada tubo se le añadió 1.5 g de bolitas con las que lisar las células procarióticas (proporcionadas por el fabricante), así como 2.5, 0.25 y 0.8 mL de las soluciones Bead Solution, SR1 y SR2, respectivamente. Dichas soluciones contribuyen a la lisis celular así como a la degradación de lípidos, ácidos grasos y proteínas gracias a un tampón específico, SDS (dodecil sulfato sódico) y a un reactivo que precipita las partículas inorgánicas y orgánicas (a excepción de los ácidos nucleicos). Dichos reactivos se encuentran incluidos en la composición de las soluciones Bead Solution, SR1 y SR2, respectivamente. A su vez se añadieron 3.5 mL de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 6.7-8.0) y se aplicó vórtex manualmente hasta que las dos fases formadas desaparecieron. Para lograr una lisis celular homogénea y uniforme, todos los tubos fueron colocados en un mismo adaptador de vórtex y agitados simultáneamente durante 15 min.

Posteriormente se centrifugaron los tubos a 6000 rpm durante 10 min, logrando así la separación de tres fases: la inferior o fenólica (en la cual se hallaban las proteínas y el *debris* celular), la interfase conteniendo los ácidos húmicos propios del suelo así como otros componentes de la materia orgánica e inorgánica, y la fase superior de naturaleza acuosa en la que se hallaban los ácidos nucleicos. Así pues, la fase superior fue transferida cuidadosamente a nuevos tubos limpios, adicionando a cada uno de ellos 1.5 mL de la solución SR3 incluida en el kit. Se aplicó vórtex a cada tubo brevemente, y todos los tubos fueron incubados a 4 °C durante 10 min para lograr que precipitaran los restos celulares y las proteínas remanentes gracias a la solución de precipitación SR3.

Materiales y Métodos

Los tubos fueron centrifugados a 6000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante fue transferido cuidadosamente por decantación a nuevos tubos. Sobre los mismos se añadió 5 mL de la solución SR4, se aplicó vórtex para su mezcla, y se procedió a una incubación durante 30 min a temperatura ambiente para que tuviera lugar la precipitación de los ácidos nucleicos gracias al isopropanol contenido en la solución SR4. Transcurrido dicho periodo, se centrifugaron los tubos a 6000 rpm durante 30 min eliminando a continuación el sobrenadante mediante decantación. Los tubos fueron colocados de forma invertida sobre papel de filtro por un periodo de 5 min.

A continuación, se añadió 1 mL de la solución salina SR5 a cada tubo y se pipeteó repetidamente para resuspender el *pellet* que contenía los ácidos nucleicos precipitados en el fondo de cada tubo. De forma paralela, las columnas de captura de RNA proporcionadas por el fabricante fueron colocadas en tubos nuevos y equilibradas con 2 mL de la solución SR5, dejando fluir completamente la solución a lo largo de las columnas por efecto de la gravedad. Inmediatamente después, las muestras que contenían los ácidos nucleicos resuspendidos fueron cargadas en dichas columnas, dejando que fluyeran completamente por gravedad. De esta manera, los ácidos nucleicos quedan retenidos en la matriz de la columna.

Tras descartar los eluidos, las columnas fueron lavadas con 1 mL de solución SR5, dejando nuevamente que dicha solución fluyera por gravedad a lo largo de las mismas. Al tratar las columnas con dicha solución, los contaminantes no retenidos en la matriz son eliminados, por lo que a continuación se transfirieron todas las columnas a tubos nuevos, para proceder a continuación con la elución de los ácidos nucleicos.

Así pues, se añadió 1 mL de la solución SR6 a cada columna y se dejó fluir por gravedad a lo largo de las mismas. Puesto que la solución SR6 proporcionada por el fabricante es un tampón que permite eluir selectivamente el RNA de la matriz de las columnas y deja el DNA y posibles contaminantes retenidos en la misma, se recuperó el eluido en cada caso (conteniendo el RNA), y se transfirió cada columna (conteniendo el DNA retenido) a un tubo nuevo.

Por un lado, cada eluido recuperado – en el que se hallaba el RNA – fue transferido a un nuevo tubo y reservado.

Por otro lado, para lograr la elución del DNA retenido en la matriz de las columnas se adicionó 1 mL de la solución SR8 a cada una de ellas, dejando que la solución fluyera completamente por gravedad. El eluido fue por lo tanto recuperado en cada tubo, descartando las columnas definitivamente.

En ambos casos, se añadió 1 mL de la solución SR4 a todos los tubos, invirtiendo los mismos repetidamente y conservándolos a -20 °C durante 10 min. Todos los tubos fueron a continuación centrifugados durante 15 min a 12,000 rpm para lograr la precipitación de ambos ácidos nucleicos. El sobrenadante de todos los tubos fue eliminado por decantación, y estos fueron colocados de forma invertida sobre papel de filtro durante 10 min con el objetivo de eliminar el exceso de líquido.

Finalmente, se añadió 100 µL de la solución SR7 (agua destilada libre de DNAsas y RNAsas) a cada tubo para resuspender los ácidos nucleicos, y los tubos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

M.4.1.2. Extracción de DNA total bacteriano a partir de cultivos líquidos

Para la extracción de DNA total a partir de cultivos líquidos bacterianos, se empleó el kit RealPure genomic DNA extraction kit (Durviz, S.L.U., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Inicialmente las cepas bacterianas fueron crecidas *overnight* (de 12 a 16 horas) en las condiciones y medios de cultivo indicados en el Apartado M.6.4.1., y posteriormente se recuperó 1 mL de cada cultivo en tubos eppendorfs. Estos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 30 s siendo el *pellet* celular resuspendido en 600 µL de la Solución de lisis proporcionada por el fabricante. Los tubos fueron entonces incubados a 80 °C durante 5 min para lograr la lisis celular.

A continuación, se añadió 3 µL de RNasa proporcionada por el fabricante (10 mg/mL) a cada tubo, y estos fueron mezclados por inversión e incubados a 37 °C durante 1 h para lograr la degradación del RNA. Transcurrido dicho periodo, se añadió Solución de precipitación de proteínas (300 µL) incluida en el kit y se agitaron los tubos vigorosamente. Estos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 5 min, momento en el cual se pudo apreciar el precipitado proteico en el fondo de los tubos.

Por el contrario, el sobrenadante – en el que se halla el DNA – fue transferido a tubos eppendorf que contenían 600 µL de isopropanol frío (4 °C), y estos fueron mezclados cuidadosamente por inversión. Nuevamente los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 3 min, y el *pellet* de DNA fue lavado con 600 µL de etanol frío al 70% (v/v) y mediante inversión de los tubos.

Para eliminar el etanol, se centrifugaron a 12,000 rpm los tubos durante 2 min y este fue eliminado cuidadosamente por decantación. El DNA fue secado completamente en un desecador termoestático a vacío Vacuo-Temp (JP Selecta®, España) durante 10 min a 70 °C, y finalmente se hidrató en 200 µL de Solución de hidratación.

M.4.2. Síntesis de ds-cDNA (*double stranded complementary DNA*, DNA complementario de doble cadena) a partir de RNA total

M.4.2.1. Digestión de DNA

Para eliminar el posible DNA contaminante presente en muestras de RNA, se llevó a cabo una digestión empleado la DNasa I DNase I recombinant RNase-free y el correspondiente tampón de incubación proporcionados por Roche (Alemania). La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 150 µL, empleando la mezcla de reacción detallada en la Tabla M.2. Cabe destacar que en la mezcla se incluyó un inhibidor de las RNasas de tipo A, B y C para evitar en gran medida la degradación del RNA durante la digestión del DNA (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Invitrogen, EEUU).

Materiales y Métodos

Tabla M.2. Composición de la mezcla de reacción empleada para la digestión de DNA en muestras de RNA total.

Componente	Cantidad, concentración o volumen final
RNA total	100 µL
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL)	160 U ^a
DNase I recombinant RNase-free (10 U/µL)	10 U ^a
Tampón de incubación (10x)	1x (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl ₂ 6 mM, CaCl ₂ 1 mM, pH 7.9)
Agua milliQ	Hasta 150 µL

^a Se indica la cantidad final añadida

Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 45 min para que tuviera lugar la reacción. Posteriormente, a cada muestra se le añadió 150 µL de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 6.7-8), se aplicó vórtex y se procedió a la incubación de las muestras durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos.

A cada uno de ellos se añadió 30 µL de NaCl (5 M) y 600 µL de etanol absoluto mantenido a 4 °C, y se procedió a una centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. Tras descartar el sobrenadante, los tubos fueron colocados de forma invertida sobre papel de filtro hasta el secado del *pellet* formado. Este fue posteriormente resuspendido en 16 µL de agua milliQ libre de DNasas y RNasas.

Así pues, los productos obtenidos fueron empleados como molde para la amplificación del gen *rrs* por PCR (ver Apartado M.4.3.1.) con el objetivo de verificar la eficiencia de la digestión del posible DNA contaminante.

M.4.2.2. Síntesis de ss-cDNA (*single stranded complementary DNA*, DNA complementario de cadena sencilla)

La reacción de retrotranscripción a partir de RNA se llevó a cabo utilizando como *primers* una mezcla de *random hexamers* o hexámeros aleatorios de estructura 5'- d(NNNNNN)-3', siendo *N* cualquiera de los nucleótidos adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T). Para romper estructuras secundarias del RNA y realizar el anillamiento de los *primers*, a cada tubo conteniendo RNA libre de DNA contaminante se le añadió 5 µL de una mezcla 100 µM de *random hexamer primers* (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y los tubos fueron incubados a 70 °C durante 10 min. Inmediatamente después, estos fueron introducidos en hielo durante 5 min.

Tras darle un breve centrifugado (*spin*) a los tubos, se procedió a la reacción de retrotranscripción haciendo uso de la transcriptasa reversa SuperScript™ II de Invitrogen (EEUU). El propio fabricante proporciona el tampón para la síntesis de la primera hebra de cDNA, así como DTT (1,4 Ditiotreitól) con el que romper posibles estructuras secundarias del RNA. La retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de 30 µL, empleando la mezcla de reacción detallada en la Tabla M.3.

Tabla M.3. Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de ss-cDNA.

Componente	Cantidad, concentración o volumen final
<i>Random hexamer primers</i> anillados al RNA total	20 µL
First-strand buffer (5x)	1x (Tris-HCl 25 mM, KCl 37.5 mM, MgCl ₂ 1.5 mM, pH 8.3)
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (25 mM cada uno)	0.5 mM cada uno
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL) (Invitrogen, EEUU)	20 U ^a
SuperScript™ II (200 U/µL)	300 U ^a

^a Se indica la cantidad final añadida

La mezcla fue incubada a 42 °C, y al cabo de 1 h se añadió 200 U de SuperScript™ II, incubando nuevamente 1 h a la misma temperatura.

M.4.2.3. Síntesis de ds-cDNA

La síntesis de cDNA de doble cadena requiere la degradación previa de la hebra de RNA del dúplex o híbrido DNA-RNA formado durante una reacción de transcripción reversa, gracias a enzimas con actividad RNasa H. Una vez eliminado el RNA es preciso sintetizar la hebra complementaria al DNA, por ejemplo, mediante una polimerasa de DNA de tipo I. Enzimas como la DNA ligasa catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3' hidroxilo y 5' fosfato de fragmentos de DNA de doble cadena, ligando los posibles *nicks* generados.

Por lo tanto, para la síntesis de ds-cDNA se emplearon, respectivamente, los enzimas RNasa H (Roche, Alemania), DNA polimerasa I de Promega (EEUU), y DNA ligasa junto con su tampón de reacción, estos dos últimos proporcionados por Invitrogen (EEUU). La reacción tuvo lugar mediante incubación de los tubos conteniendo la mezcla de reacción indicada en la Tabla M.4 durante 2 h a 15 °C.

Tabla M.4. Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de ds-cDNA.

Componente	Concentración, cantidad o volumen final
ss-cDNA	30 µL
dNTPs (25 mM cada uno)	0.25 mM cada uno
RNase H (10 U/µL)	2 U ^a
DNA polymerase I (10 U/µL)	30 U ^a
<i>E. coli</i> DNA Ligase (10 U/µL)	5 U ^a
Buffer DNA Ligase (10x)	1 x (Tris-HCl 18.8 mM, KCl 90.6 mM, MgCl ₂ 4.6 mM, DTT 3.75 mM, λ-NAD 0.15 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM, pH 8.3)
Agua milliQ	Hasta 75 µL

^a Se indica la cantidad final añadida

M.4.2.4. Obtención de ds-cDNA de extremos romos

La generación de fragmentos de DNA complementario de doble cadena con extremos romos fue lograda añadiendo 12 U de T4 DNA Ligasa (5 U/μL; Invitrogen, EEUU) a 75 μL del producto obtenido tras una reacción de síntesis de ss-DNA, e incubando la mezcla durante 30 min a 15 °C.

M.4.3. Amplificación de DNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa)

Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Alemania), y empleando el kit comercial Master Taq® (5 PRIME GmbH, Alemania). Dicho kit incluye el enzima Taq DNA polimerasa, un tampón para dicho enzima, una solución de magnesio (Mg²⁺), y un tampón que mejora la estabilidad y actividad del enzima ya que contiene inhibidores de potenciales contaminantes de la PCR (TaqMaster PCR Enhancer).

La composición de la mezcla de PCR fue la misma en todos los casos (Tabla M.5), llevándose a cabo las reacciones siempre en un volumen final de 25 μL.

Tabla M.5. Composición de la mezcla de reacción de PCR.

Componente	Cantidad, concentración o volumen final
DNA molde (genómico, DNA rizosférico o ds-cDNA)	2-20 ng ^a
Tampón del enzima (10x)	1x (Mg ²⁺ , 1.5 mM)
Solución de magnesio (25 mM)	1 mM ^b
TaqMaster PCR Enhancer (10x)	1x
dNTPs (2.5 mM cada uno)	0.25 mM cada uno ^c
Primer directo o <i>forward</i> (10 μM)	0.4 μM
Primer reverso o <i>reverse</i> (10 μM) ^d	0.4 μM
Taq DNA polimerasa (5 U/ μL)	0.75 U ^e
Agua milliQ	Hasta 25 μL

^a En el caso de la amplificación de las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen *rrs* para la obtención de las librerías para pirosecuenciación, se añadió 10 ng.

^b Concentración final de Mg²⁺ en la mezcla de reacción, 2.5 mM.

^c En el caso de la amplificación de las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen *rrs* para la obtención de las librerías para pirosecuenciación, la concentración final de cada uno fue 0.1 mM.

^d Para la obtención de los perfiles RAPD la reacción de PCR fue llevada a cabo exclusivamente con un único *primer* (ver Tabla M.7.).

^e Se indica la cantidad final añadida.

M.4.3.1. Amplificación de genes concretos

Para la identificación taxonómica bacteriana se amplificaron diferentes genes mediante PCR, en función los organismos específicos en estudio.

Por un lado, se amplificó el gen *rrs* que codifica el 16S rRNA de la subunidad pequeña (30S) del ribosoma procariota (Rajendhran y Gunasekaran, 2011), empleando

los *primers* 9bfm y 1512uR específicos para el dominio Bacteria, y Bacteria y Archaea, respectivamente (Tabla M.7).

En determinados casos se amplificaron genes *housekeeping*, de copia única en los genomas bacterianos, altamente expresados y ciertamente conservados. Concretamente se estudiaron los genes *recA* (implicado en la síntesis de parte del sistema de recombinación y reparación del DNA procariota), *atpD* (codifica la subunidad β de la ATP sintetasa de membrana procariota), *glnII* (codifica la glutamina sintetasa de clase II) y *rpoD* que codifica el factor σ^{70} de la DNA polimerasa.

Adicionalmente se amplificó el gen *nodC* que codifica la *N*-acetilglucosaminiltransferasa implicada en la síntesis de los factores de nodulación de los rizobios.

La composición de la mezcla de reacción de PCR fue la misma para la amplificación de todos los genes (ver Tabla M.5), si bien las condiciones de PCR y la pareja de *primers* empleados fueron específicos para cada gen, tal y como se detalla en las Tablas M.6 y M.7, respectivamente. Cabe destacar que todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ L, y que en todos los casos se incluyó un control negativo de la amplificación en el que el DNA molde fue reemplazado por agua milliQ.

Materiales y Métodos

Tabla M.6. Condiciones de PCR para la amplificación de genes concretos, regiones génicas y secuencias genómicas aleatorias.

Gen o secuencia diana a amplificar	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Descripción
<i>rrs</i>	1	94	4 min	Desnaturalización inicial
	25	94	1 min	Desnaturalización
		52	1 min	<i>Annealing primers</i>
		72	1 min 30 s	Extensión
	1	72	10 min	Extensión final
<i>recA</i>	1	95	3 min 30 s	Desnaturalización inicial
	25	95	1 min	Desnaturalización
		55	1 min	<i>Annealing primers</i>
		72	1 min	Extensión
	1	72	5 min	Extensión final
<i>atpD</i>	1	95	3 min 30 s	Desnaturalización inicial
	25	95	1 min	Desnaturalización
		59	1 min	<i>Annealing primers</i>
		72	1 min	Extensión
	1	72	5 min	Extensión final
<i>glnII</i>	1	95	3 min 30 s	Desnaturalización inicial
	25	95	1 min	Desnaturalización
		58	1 min	<i>Annealing primers</i>
		72	1 min	Extensión
	1	72	5 min	Extensión final
<i>nodC</i>	1	95	5 min	Desnaturalización inicial
	25	95	45 s	Desnaturalización
		58	1 min	<i>Annealing primers</i>
		72	45 s	Extensión
	1	72	5 min	Extensión final
<i>rpoD</i>	1	94	5 min	Desnaturalización inicial
	25	94	1 min	Desnaturalización
		63	1 min	<i>Annealing primers</i>
		72	1 min 30 s	Extensión
	1	72	10 min	Extensión final
Secuencia aleatorias (gen III del bacteriófago M13)	1	95	9 min	Desnaturalización inicial
	35	95	1 min	Desnaturalización
		45	1 min	<i>Annealing primer</i>
		75	2 min	Extensión
	1	72	7 min	Extensión final
Regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen <i>rrs</i>	1	94	4 min	Desnaturalización inicial
	25	94	15 s	Desnaturalización
		55	45 s	<i>Annealing primers</i>
		72	1 min	Extensión
	1	72	10 min	Extensión final

Tabla M.7. Primers empleados para la amplificación de genes concretos y secuencias genómicas aleatorias.

Diana a amplificar	Primer	Sentido ^a	Secuencia (5'-3') ^b	Tamaño aprox. amplicón (pb)
<i>rrs</i>	9bfm ^c	F	GAGTTTGATYHTGGCTCAG	1500
	1512uR ^c	R	ACGGHTACCTTGTTACGACT	
<i>recA</i>	recA6 ^e	F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	550
	recA555 ^e	R	CRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	
<i>atpD</i>	atpD273 ^e	F	SCTGGGSCGYATCMTGAACGT	450
	atpD771 ^e	R	GCCGACACTTCCGAACCGCCTG	
<i>glnII</i>	glnII-12FP ^f	F	YAAGCTCGAGTACATYTGGCT	700
	glnII-689R ^f	R	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA	
<i>nodC</i>	nodCF ^g	F	AYGTHGTYGAYGACGGTTC	900
	nodCI ^g	R	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	
<i>rpoD</i>	PsEG30F ^h	F	ATYGAAATCGCCAARCG	740
	PseEG790R ^h	R	CGGTTGATKTCCTTGA	
Secuencia aleatorias (gen III del bacteriófago M13)	M13 ⁱ	F	GAGGGTGGCGGTTCT	Desconocido

^a F, Forward (directo); R, Reverse (reverso)

^b Degeneraciones: Y (C o T); H (A o T o C); K (G o T); S (G o C); R (A o G); M (A o C); N (A o C o T o G).

^c Mühling *et al.*, (2008)

^g Laguerre *et al.*, (2001)

^d Weisburg *et al.*, (1991)

^h Mulet *et al.*, (2009)

^e Gaunt *et al.*, (2001)

ⁱ Huey y Hall (1989)

^f Vinuesa *et al.*, (2005)

Cabe destacar que todos los genes fueron amplificados parcialmente debido a la posición interna de los *primers*.

M.4.3.2. Genotipado de cepas mediante marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La obtención de los perfiles RAPD habitualmente se logra empleando un *primer* de pequeño tamaño con el que se amplifican secuencias genómicas aleatorias. En este caso se seleccionó el *primer* M13 (Tabla M.7), el cual se caracteriza por ser una secuencia repetitiva de 15 pb incluida en el gen III del bacteriófago M13, y por ende, ampliamente distribuida en los genomas procariotas.

Se llevó a cabo una amplificación mediante PCR de dichos fragmentos empleando para la reacción los componentes que se detallan en la Tabla M.5. En este caso, como único *primer* se seleccionó el citado M13, tal y como sugieren Rivas y colaboradores (2006). Las condiciones de PCR fueron las descritas en la Tabla M.6.

M.4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La comprobación de la extracción del DNA total y el análisis de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa no desnaturalizantes.

En función del tamaño del fragmento de DNA a visualizar, se prepararon geles de agarosa al 0.8 ó 1.5% (p/v) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM; Na₂EDTA·2H₂O 2 mM; ácido acético glacial 0.114% (v/v); pH 8.5). Si bien habitualmente se cargó 5 µL de cada muestra en el gel junto con 1 µL de tampón de carga 6x (Glicerol 50% (v/v); Orange G 0.5% (p/v); EDTA 10 mM; pH 8), para la visualización de los perfiles RAPD se cargó un mayor volumen de muestra (10 µL) y tampón de carga (2 µL).

Junto con las muestras, en el gel se cargaron marcadores de peso molecular en función del tamaño esperado del fragmento de DNA a visualizar. Concretamente se emplearon el marcador II (genoma del fago λ digerido con el enzima *Hind*III, cuyo perfil de restricción se compone de ocho fragmentos de entre 125 y 23,130 pb) y el marcador φ29 (genoma del fago φ29 digerido con *Hind*III, que resulta en fragmentos de tamaño de 72 a 4370 pb), ambos proporcionados por el Servicio de Fermentación del Centro de Biología Molecular, CSIC (Madrid, España). En la mayoría de los casos la electroforesis fue llevada a cabo en tampón TAE 1x a 10 V/cm (6 V/cm para la separación de los productos RAPD).

El revelado de los geles fue realizado tras la inmersión de los mismos en solución acuosa de tinción de ácidos nucleicos GelRedTM (100 µL/L) de Biotium Incorporation (EEUU) durante 45-60 min y posterior exposición a luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda. La visualización de los geles y su fotografiado se realizó con los sistemas de documentación de geles Gelprinter y Gelstation (Tecnología para Diagnóstico e Investigación TDI, España).

M.4.5. Purificación de productos de PCR

El procedimiento seguido para la síntesis de determinados productos como ds-cDNA o amplicones de DNA se fundamenta en reacciones enzimáticas en las que están implicados diferentes tampones, sales, enzimas y otros componentes que pueden interferir en posteriores reacciones como las de secuenciación. Es por ello que resulta necesario incluir un paso adicional de purificación hasta obtener un producto libre en su práctica totalidad de posibles contaminantes o impurezas.

M.4.5.1. Método de purificación directa

Las columnas comerciales IllustraTM MicroSpinTM S-300 HR Columns (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido), se encuentran especialmente indicadas para la eliminación de moléculas de gran tamaño (e.g., DNA molde empleado en las reacciones de PCR), así como aquellas de pequeño tamaño, e.g., *primers* y nucleótidos libres. Es por ello que fue el sistema elegido para purificar los productos de PCR en aquellos casos en los que en el gel de agarosa se observó una única banda del tamaño correspondiente al esperado.

Concretamente, se resuspendió la resina contenida en el interior de las columnas mediante vórtex, y estas se dispusieron en tubos colectores proporcionados por el fabricante, los cuales fueron inmediatamente centrifugados durante 1 min a 2700 rpm. De forma paralela, se añadió agua milliQ (20 µL) a cada tubo de PCR conteniendo los productos de la amplificación, y estas muestras fueron cargadas en las columnas. Finalmente se llevó a cabo un paso de centrifugación a 2700 rpm durante 2 min, y se recuperó el eluido.

M.4.5.2. Método de purificación indirecta

La presencia de varias bandas en el gel de agarosa en determinados casos hizo necesario el aislamiento de las bandas de interés directamente de los geles de electroforesis. A tal fin se empleó el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Las fracciones del gel de agarosa en las que se visualizaban las bandas de un tamaño similar al esperado fueron cortadas con un bisturí limpio y estéril e introducidas en tubos eppendorf para posteriormente calcular su masa. Cabe destacar que durante el proceso de extracción de las bandas, la porción del gel de agarosa que no estaba siendo procesada fue cubierta con papel de aluminio para evitar las posibles alteraciones del DNA debidas a la exposición prolongada a luz ultravioleta.

Por cada 10 mg de fragmento de agarosa, se añadió 10 µL del tampón de captura 3 (incluido en el mencionado kit) con el que desnaturalizar las proteínas y disolver la agarosa. Los tubos se agitaron por inversión y se incubaron a 60 °C hasta que la agarosa se había disuelto por completo (15-20 min).

A continuación, por cada una de las muestras se colocó una columna GFX MicroSpin en un tubo colector y sobre esta se cargó hasta 800 µL de las muestras tratadas previamente con el tampón de captura 3. Se procedió a una incubación a temperatura ambiente durante 1 min para que tuviera lugar la unión del DNA a la resina de las columnas, y una vez estas estuvieron cargadas se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 s descartando a continuación el eluido.

Las columnas fueron nuevamente colocadas en el mismo tubo colector y sobre estas se añadió tampón de lavado 1 (500 µL) incluido en el kit para conseguir eliminar las sales presentes en las muestras. Posteriormente, los tubos con las columnas fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 30 s, transfiriendo las columnas a tubos eppendorf limpios. Sobre estas se añadió tampón de elución 6 (30 µL) proporcionado por el fabricante (agua libre de DNAsas).

Tras incubar a temperatura ambiente durante 1 min los eppendorf con las columnas acopladas, estos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 1 min y finalmente se recuperó el eluido en el que se hallaba el DNA de interés purificado.

M.4.5.3. Método de purificación y ultraconcentración

En aquellos casos en los que la aplicación posterior requería un elevado nivel de pureza y la concentración de la muestra purificada era crítica, se hizo uso del sistema Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices Ultracell®-100K (Merck Millipore, Irlanda). En concreto, por cada una de las muestras a purificar se dispuso una columna en un tubo colector (ambos proporcionados por el fabricante) y se cargaron las muestras (previamente diluidas en agua milliQ hasta alcanzar un volumen total de 500 µL). Los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 10 min, descartando el filtrado y colocando nuevamente en el mismo tubo la columna en la que se hallaban retenidos los ácidos nucleicos a purificar. La centrifugación fue repetida dos ocasiones más.

Inmediatamente después, cada columna se colocó de forma invertida en un tubo nuevo, y se procedió a la centrifugación de los mismos en esta posición a 3300 rpm

durante 2 min para que tuviera lugar la transferencia de los ácidos nucleicos de la membrana al tubo.

M.4.6. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

M.4.6.1. Método espectrofotométrico

Mediante la medición de la absorbancia de muestras acuosas a una longitud de onda de 260 nm es posible determinar la concentración de los ácidos nucleicos en solución. A tal fin se hizo uso del espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer de Thermo Fisher Scientific (EEUU) gracias al cual es posible determinar la concentración de diferentes tipos de ácidos nucleicos utilizando 1 µL de muestra. Como blanco se empleó el mismo volumen del diluyente en el que se encuentra disuelta la muestra.

M.4.6.2. Método fluorimétrico

En aquellos casos en los que fue necesario determinar la concentración de DNA de doble cadena con un alto nivel de sensibilidad, se empleó el fluorímetro Qubit® 3.0 y el kit comercial Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay kit de Invitrogen-Life technologies (EEUU). Este sistema permite cuantificar con gran sensibilidad la intensidad de la fluorescencia emitida por un fluoróforo cuando este se halla unido selectivamente al DNA de doble cadena.

En primer lugar, se preparó la solución de trabajo diluyendo el fluoróforo proporcionado por el fabricante (Qubit dsDNA HS Reagent) en el tampón incluido en el propio kit (Qubit dsDNA buffer). Ambos fueron mezclados en una proporción 1:200 y un volumen final de la mezcla de 200 µL por cada muestra.

Los patrones de referencia fueron preparados diluyendo 10 µL de cada patrón (proporcionados por el fabricante y de concentración predefinida) en 190 µL de la solución de trabajo recién preparada. Ambos componentes fueron mezclados mediante vórtex durante 2-3 s.

Finalmente, las muestras a cuantificar fueron mezcladas en proporción 1:200 con la solución de trabajo que incluye el fluoróforo, y en un volumen final de 200 µL, siendo homogeneizadas mediante vórtex durante 2-3 s. Tras 2 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se procedió a la cuantificación de la concentración de los ácidos nucleicos tomando como referencia los patrones preparados.

M.4.7. Secuenciación de fragmentos de DNA

M.4.7.1. Secuenciación Sanger de amplicones de DNA

La secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR se realizó en todos los casos de forma bidireccional (de 5' a 3' y de 3' a 5'). Para poder obtener la secuencia prácticamente completa de los genes en estudio, se realizaron al menos dos reacciones de secuenciación de cada producto de PCR individualizadas e independientes, esto es, en cada una se empleó un *primer* específico (*Forward* y *Reverse*). Así pues, por cada *primer* se preparó una reacción de secuenciación la cual incluía 40 ng del producto de PCR purificado (previamente cuantificado según se describe en el Apartado M.4.6.1), el *primer* correspondiente (0.5 µM) y agua milliQ hasta un volumen final de 12 µL.

Los *primers* empleados para las reacciones de secuenciación fueron los mismos que con los que se llevaron a cabo las reacciones de PCR (Tabla M.7). Cabe destacar que para la secuenciación del gen *rrs* se emplearon adicionalmente dos *primers* internos, concretamente los denominados Z4 (5' CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3') y X11 (5' GAGGAAGGTGGGGATGACGTC 3') descritos por Rivas y colaboradores (2006). Ambos fueron empleados para obtener las secuencias de las regiones distales de los extremos 5' y 3' de los amplicones, respectivamente, y así lograr secuencias del mayor tamaño y calidad posible. En la Figura M.2 se muestra la estrategia empleada para secuenciar el gen *rrs*.

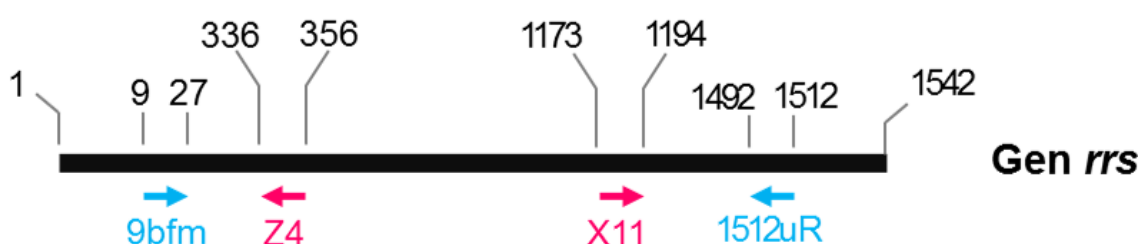


Figura M.2. Esquema de la localización de los *primers* empleados para la secuenciación del gen *rrs*. Los números representan las posiciones de los *primers* en el correspondiente gen de *E. coli* (pb).

Todas las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo por el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (Granada, España) mediante electroforesis capilar y tecnología Sanger en un secuenciador automático ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, EEUU), tal y como recomienda el fabricante.

M.4.7.2. Secuenciación masiva de alta calidad de regiones hipervariables del gen *rrs*

En el presente trabajo se emplearon dos tecnologías diferentes de secuenciación de segunda generación, atendiendo a la clasificación realizada por Knief (2014). Concretamente se llevó a cabo la secuenciación de diferentes regiones hipervariables del gen *rrs* por síntesis, mediante tecnología 454 de Roche y la plataforma MiSeq de Illumina.

Pese a las diferencias inherentes a cada tecnología, ambas plataformas coinciden en ciertos aspectos relativos a la preparación de las librerías. En ambos casos es necesario añadir adaptadores específicos de DNA al DNA molde para permitir la unión de los fragmentos a secuenciar a una superficie (microbolitas en el caso de la tecnología 454 y una placa de cristal si se trata de la tecnología de Illumina). Además, dichos adaptadores permiten la amplificación de los fragmentos de la librería mediante PCR en emulsión (pirosecuenciación) o PCR puente (Illumina) (Knief, 2014).

Por otro lado, estas tecnologías permiten juntar diferentes librerías y secuenciarlas simultáneamente en la misma fracción de una placa picotituladora de 454 o en una misma línea de una placa Illumina, gracias a la inclusión de una secuencia específica de DNA en los *primers* empleados. Dichas secuencias son denominadas

MIDs (*Multiplex Identifiers; Molecular Identifiers*), también conocidas como *códigos de barras*. Se trata de fragmentos de 5-10 nucleótidos, poco frecuentes en la naturaleza, y suficientemente diferentes como para ser distinguidos entre sí incluso en caso de que la DNA polimerasa cometa errores durante la amplificación por PCR. Puesto que la secuencia de los MIDs puede ser elegida por el usuario, durante el tratamiento bioinformático de los datos es posible identificar e individualizar las lecturas procedentes de cada una de las muestras, llevando a cabo la secuenciación de múltiples muestras al mismo tiempo (Knief, 2014).

M.4.7.2.1. Preparación y secuenciación de librerías mediante tecnología 454 (Roche)

Mediante la tecnología 454 de Roche fue posible llevar a cabo la secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen *rrs*, empleando como molde el DNA y ds-cDNA extraído de la rizosfera de cada uno de los robles muestreados en 2013. Para ello, en primer lugar fue necesario obtener los amplicones de dichas regiones con *primers* diseñados especialmente para este tipo de secuenciación.

Los *primers* de pirosecuenciación se diseñaron modificando la pareja de *primers* U341F y U926R (Baker *et al.* 2003), universales para los dominios Bacteria y Archaea. Estos fueron modificados de tal forma que los adaptadores A y B necesarios para la pirosecuenciación (Tabla M.8) fueron adicionados a la secuencia del *primer Forward* y del *Reverse*, respectivamente. Por otro lado, se seleccionaron nueve códigos de barras de los diseñados por Parameswaran y colaboradores (2007), descartando los dos primeros nucleótidos en posición 5' con el objeto de emplear *primers* funcionales del menor tamaño posible (ocho nucleótidos en el presente caso).

Puesto que la secuenciación fue unidireccional – únicamente se empleó un *primer* complementario a uno de los adaptadores (adaptador B) para llevar a cabo la secuenciación por síntesis – tan solo fue necesario incluir el MID en los *primers Reverse*. La estructura definitiva de los *primers* empleados para la pirosecuenciación puede observarse en la Figura M.3, mientras que las secuencias de los adaptadores, los códigos de barras y los *primers* U341F y U926R se recogen en la Tabla M.8.



Figura M.3. Representación gráfica de la estructura de la pareja de *primers* empleados para la pirosecuenciación de amplicones de las regiones V3-V4-V5 del gen *rrs*. La secuencia de ambos adaptadores, MIDs y *primers* figura en la Tabla M.8.

Tabla M.8. Secuencia de los adaptadores, MIDs y *primers* empleados para la pirosecuenciación de amplicones de las regiones V3-V4-V5 del gen *rrs*. La secuencia de los tres elementos mencionados fue la misma en el caso de secuenciar tanto DNA como ds-cDNA.

Elemento	Muestra	Secuencia (5'- 3') ^a
Adaptador A	HAF1-3; BRF1-3; XZF1-3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG
Adaptador B		CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG
Primer U341F^b	HAF1-3; BRF1-3; XZF1-3	CCTACGGGRSGCAGCAG
Primer U926R^b		CCGTCAATTCCTTTT ^c RAGTTT
MID^c	HAF1	CCTCCTGA
	HAF2	TTAGGTAC
	HAF3	AAGAACGT
	BRF1	CCGTTACG
	BRF2	CCTGGCAT
	BRF3	TTCAAGTC
	XZF1	GGCAATGC
	XZF2	CCATTGCA
	XZF3	GGCTTCAG

^a Degeneraciones: R (A o G); S (G o C).

^b Baker *et al.* (2003)

^c Modificado de Parameswaran y colaboradores (2007)

Una vez diseñados los *primers* específicos, se procedió a la obtención de los amplicones correspondientes mediante amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen *rrs* en un termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Alemania). Para la amplificación se empleó el kit comercial Master *Taq*® (5 PRIME, Alemania), realizando las reacciones en un volumen final de 25 µL y empleando la mezcla de reacción que se encuentra detallada en la Tabla M.5. Cabe destacar que para cada muestra se realizaron las reacciones de PCR por triplicado.

Las condiciones de la PCR fueron las indicadas en la Tabla M.6, destacando la programación de 25 ciclos de desnaturalización, anillamiento de *primers* y extensión para reducir la aparición de quimeras, ya que la cantidad de estas aumenta considerablemente tras 24-25 ciclos (Acinas *et al.*, 2005).

Comprobado el éxito de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (ver Apartado M.4.4.), y siguiendo el diseño experimental que se detalla más adelante, los productos de PCR que poseían el mismo código de barras fueron mezclados. Dichas mezclas compuestas fueron purificadas individualmente empleando el sistema descrito en el Apartado M.4.5.3. y seguidamente cuantificadas siguiendo el método fluorimétrico detallado en el Apartado M.4.6.2. A continuación, las mezclas compuestas purificadas fueron mezcladas equimolecularmente, obteniéndose de esta forma una muestra para los amplicones del DNA y otra para los derivados del RNA.

La secuenciación de las mismas fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación de DNA de la Estación Experimental del Zaidín (Granada, España) mediante la plataforma de pirosecuenciación 454 Genome Sequencer FLX de Roche y los reactivos específicos para la secuenciación unidireccional.

M.4.7.2.2. Secuenciación mediante tecnología MiSeq (Illumina)

Las regiones hipervariables V4-V5 del gen *rrs* fueron secuenciadas tomando como molde el DNA extraído de la rizosfera de los individuos de *Q. pyrenaica* muestreados en el año 2015 (ver Apartado M.1). Sólo se amplificaron estas dos regiones hipervariables ya que con la tecnología Illumina es posible secuenciar fragmentos de no más de 300 pb.

Para la secuenciación mediante Illumina, se empleó el *primer Forward* U519F descrito por Suzuki y Giovannoni (1996) (5' CAGCMMGCCGCGGTAATWC 3', donde M equivale a los nucleótidos A o C, y W a A o T) y el *Reverse* U926R de Baker *et al.*, (2003), cuya secuencia figura en la Tabla M.7. En este caso, la preparación de las librerías fue realizada íntegramente por la empresa responsable de la secuenciación (Macrogen Incorporated, Corea), quien adicionó los MIDs y adaptadores a los *primers* de secuenciación definitivos.

Así pues, el DNA molde fue directamente enviado a dicha empresa según los requerimientos de la misma, y secuenciado en la plataforma MiSeq gracias al uso del MiSeq Reagent Kit. Dado que el tamaño máximo de las lecturas obtenidas con la plataforma MiSeq se halla sobre 300 pb, es necesario secuenciar separadamente los extremos 5' y 3' del fragmento correspondiente a las regiones V4-V5 (*paired reads*, lecturas pareadas) para posteriormente ensamblar las mismas durante el procesamiento bioinformático de las secuencias, y obtener lecturas de más de 400 pb. Así pues, por cada una de las muestras secuenciadas se obtuvieron dos tipos de lecturas.

A su vez cabe destacar que con la tecnología Illumina fue posible secuenciar individualmente las muestras obtenidas de cada uno de los árboles localizados en NPF, AZC y AZL, aumentando de esta forma en nivel de replicación (nueve árboles por tratamiento y sitio).

M.5. Análisis bioinformático

M.5.1. Procesamiento de secuencias

M.5.1.1. Procesamiento de secuencias obtenidas mediante tecnología Sanger

La calidad de las secuencias génicas obtenidas mediante tecnología Sanger (ver Apartado M.4.7.1) fue evaluada a través del software informático Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, EEUU) a partir de los electroferogramas generados para cada lectura. El extremo inicial y final de las mismas fue eliminado dada la baja calidad asociada a los nucleótidos en estas regiones, y además, se corrigieron manualmente los posibles errores de secuenciación.

A continuación, en aquellos casos en los que los genes fueron secuenciados con dos *primers* (*rrs*, *nodC* y *rpoD*) se alinearon las secuencias correspondientes a una misma cepa obtenidas con los diferentes *primers*. Para ello, se empleó la herramienta informática Clon Manager Professional Suite v6.0 (Scientific & Educational Software, EEUU), ensamblando los fragmentos parciales correspondiente a una misma cepa

hasta obtener secuencias de mayor tamaño de cada gen. Las secuencias de calidad obtenidas se compararon con aquellas presentes en la base de datos GenBank® (Benson *et al.*, 2013) mediante la herramienta informática BLASTn (Altschul *et al.*, 1990), y con aquellas de la base de datos EzTaxon (Yoon *et al.*, 2017).

M.5.1.2. Procesamiento de secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva

M.5.1.2.1. Procesamiento de datos obtenidos mediante tecnología 454

Los datos generados mediante pirosecuenciación fueron procesados haciendo uso del software Mothur version 1.33.3 (Schloss *et al.*, 2009), conforme describen Schloss y colaboradores (2011). Para poder optimizar el rendimiento computacional, dicho software fue implementado en la distribución Ubuntu 16.04.5 LTS basada en el sistema operativo Linux.

En primer lugar, gracias al comando *sffinfo* se extrajeron los flowgramas⁸, el archivo de calidad y el archivo en formato fasta a partir del archivo binario en formato sff (*standard flowgram format*) proporcionado por el servicio que llevó a cabo la secuenciación. Las lecturas fueron separadas en función de la muestra de origen teniendo en cuenta la combinación del código de barras y los *primers* empleados para la pirosecuenciación (proceso de *demultiplex*). Para ello, se empleó el comando *trim.flows* de tal forma que a partir de cada flowgrama se separaron y recuperaron las lecturas de entre 360 y 720 *flows*, permitiendo dos y tres *mismatches* (discordancias) en la secuencia del código de barras y *primer*, respectivamente.

Tras eliminar el ruido de los flowgramas con el comando *shhh.flows* y reducir así los posibles errores originados en la reacción de secuenciación, se procedió a la limpieza de las lecturas mediante el comando *trim.seqs*. Para ello, de cada lectura se eliminaron las secuencias de los códigos de barras y *primer* permitiendo nuevamente dos y tres *mismatches*, respectivamente. A su vez se descartaron todas aquellas secuencias de menos de 390 pb así como las que incluían homopolímeros de ocho o más nucleótidos. Adicionalmente se obtuvieron las secuencias reversas complementarias debido al sentido reverso de la secuenciación, para lo cual se empleó la opción *flip* incluida en el propio comando.

Los archivos procedentes de los dos *run* de secuenciación fueron fusionados una vez limpiadas las secuencias, gracias al comando *merge.files*. Debido al gran volumen de datos fue necesario disminuir la redundancia de secuencias y procesar exclusivamente aquellas que eran únicas, reteniendo tan sólo una copia de todas aquellas que eran idénticas (comando: *unique.seqs*). Una vez simplificado el conjunto

⁸ El término *flow* hace referencia al flujo de los cuatro nucleótidos (A, T, G o C) durante la reacción de pirosecuenciación. Por las características de la química de la reacción, cada *flow* o flujo de nucleótidos conduce a la emisión de luz durante el proceso. La correspondiente intensidad de señal es cuantificada mediante el *flow value* o valor de flujo, el cual es proporcional al número de nucleótidos incorporados durante cada ciclo de pirosecuenciación (excepto en el caso de homopolímeros largos). Así pues, los términos *flow* (intensidad de señal luminosa asociada a cada flujo de cuatro nucleótidos) y *flowgrama* (combinación de *flows* asociados a una determinada lectura) son empleados especialmente durante las etapas tempranas del procesamiento de datos procedentes de pirosecuenciación (Quince *et al.*, 2009; Balzer *et al.*, 2011).

Materiales y Métodos

de datos, las secuencias fueron alineadas frente a la base de datos SILVA 119 (Quast *et al.*, 2013) mediante el comando de Mothur *align.seqs*. Dicha base de datos fue seleccionada ya que contiene secuencias curadas y de calidad del gen *rrs* procariótico, además de tener en cuenta la estructura secundaria de la molécula.

El alineamiento de las secuencias en estudio frente a aquellas de referencia presentes en las bases de datos en ocasiones conduce a la inserción de *gaps* y a que ciertas secuencias no se encuentren entre los márgenes deseados del alineamiento. Por ello, se fijaron las coordenadas del alineamiento gracias al comando *screen.seqs* de tal manera que se seleccionaron únicamente aquellas secuencias que alineaban en una región concreta. La posición final del alineamiento fue fijada teniendo en cuenta que la inmensa mayoría de las secuencias alineadas tenían su fin en la misma posición dada la naturaleza reversa de la pirosecuenciación. Por el contrario, se optimizó la posición de inicio seleccionando aquella para la cual el 95% de las secuencias en estudio comenzaran antes de dicho punto. A continuación, los *gaps* fueron eliminados del alineamiento mediante el comando *filter.seqs* y nuevamente fue necesario retener las secuencias únicas con el comando *unique.seqs*.

Con objeto de reducir el esfuerzo computacional posterior al construir OTUs (*Operational Taxonomic Units*, unidades taxonómicas operacionales), mediante el comando *pre.cluster* se hizo un pre-agrupamiento de las secuencias. Gracias a este comando se agruparon todas las secuencias similares en al menos un 99% a las más abundantes, eliminando aquellas que no cumplían dicho criterio.

Posteriormente se procedió a la búsqueda de quimeras a través del comando *chimera.uchime*, el cual a su vez llama al programa UCHIME descrito por Edgar y colaboradores (2011). El algoritmo desarrollado por estos autores se basa en la división de cada una de las secuencias en estudio en cuatro fragmentos no solapantes, cada uno de los cuales es alineado contra una base de datos libre de quimeras. Para cada uno de estos fragmentos se retienen las dos secuencias parentales con las que muestran mayor porcentaje de identidad. Posteriormente el algoritmo realiza un alineamiento de tres vías, es decir, alinea cada secuencia completa en estudio y las dos mejores secuencias parentales seleccionadas para cada fragmento. Si las parejas de secuencias parentales muestran en el alineamiento regiones con un porcentaje de identidad igual o superior al 80% respecto a la secuencia en estudio y son más próximas que si se alinearan de forma independiente, entonces se calcula una puntuación para dicho alineamiento. Por tanto, si la puntuación del alineamiento de la secuencia en estudio es superior a un determinado valor de punto de corte, dicha secuencia es considerada quimérica. Es decir, el algoritmo finalmente es capaz de detectar si diferentes fragmentos de una misma secuencia en estudio proceden de organismos distintos. En este caso se empleó como referencia la base de datos Gold de SILVA para detectar las quimeras (Quast *et al.*, 2013), las cuales fueron eliminadas una vez identificadas gracias al comando *remove.seqs*.

Las secuencias restantes fueron seguidamente clasificadas utilizando el método bayesiano-naïve descrito por Wang y colaboradores (2007). Mediante este método, la

secuencia en estudio se divide en k-meros⁹ de unos 6-8 nucleótidos y compara todos ellos con las secuencias presentes en una base de datos determinada. Posteriormente calcula la probabilidad de que una secuencia de la base de datos (con una taxonomía específica asignada) contenga un k-mero concreto. En base a los k-meros que conforman la secuencia en estudio, el algoritmo determina la probabilidad de que dicha secuencia se encuentre asignada a un taxón concreto. Finalmente, la secuencia en estudio es asignada al taxón para el cual el nivel de probabilidad determinado es mayor. En este caso, mediante el empleo del comando de Mothur *classify.seqs* se ajustó el tamaño de los k-meros a ocho nucleótidos y estos fueron comparados con las secuencias presentes en la base de datos del RDP, version 10.08.20.14 (Cole *et al.*, 2014). Las secuencias en estudio fueron clasificadas y fueron asignadas a un taxón concreto en caso de que el 80% o más de los k-meros en los que fueron divididas alinearan con secuencias de la base de datos con dicha taxonomía asignada.

Puesto que las muestras a partir de las que se extrajeron los ácidos nucleicos eran de origen rizosférico, a continuación se eliminaron todas aquellas secuencias correspondientes a mitocondrias, cloroplastos o a organismos eucariotas, para lo cual se empleó el comando *remove.lineage*. Cabe mencionar que las secuencias adscritas al dominio Archaea fueron mantenidas en el análisis debido al interés de estudiar la diversidad procariota de la rizosfera, tal y como refleja el uso de los *primers* universales empleados para la amplificación del gen 16S rRNA y consiguiente pirosecuenciación (Apartado M.4.7.2.1).

A partir del alineamiento de las secuencias procarióticas de alta calidad se construyó una matriz de distancias con el comando *dist.seqs*, empleando un punto de corte del 15% de distancia. Es decir, se calculó la distancia entre cada pareja de secuencias de tal forma que fueron retenidas únicamente aquellas que mostraban más de un 85% de identidad. El objetivo que subyace tras la construcción de dicha matriz es la reducción del esfuerzo computacional y el volumen de datos con el que construir *a posteriori* los OTUs a un nivel inferior de distancia. Por ello, dichas secuencias fueron seguidamente agrupadas en OTUs al 97% de similitud (utilizando el comando *cluster* y el algoritmo *average-neighbor*), punto de corte ampliamente utilizado en los estudios de diversidad procariota ya que se estima que especies diferentes tienen un nivel de divergencia del gen 16S rRNA del 3% (Stackebrandt y Goebel, 1994).

Tal y como resumen Auer y colaboradores (2017), las técnicas de secuenciación masiva están sujetas a errores inherentes a la amplificación por PCR y/o a la propia reacción de secuenciación, los cuales pueden conducir en última instancia a la generación de secuencias únicas y OTUs representados por tan solo una secuencia. La presencia de dichos OTUs denominados *singletons* implica la sobreestimación de la diversidad α de las muestras, mientras que su eliminación del conjunto de datos tiene un bajo impacto en la diversidad β dada la relativa baja frecuencia de dichos OTUs (Edgar, 2013). Por ello, los OTUs representados por una única secuencia en el conjunto de todas las muestras en estudio fueron eliminados con el comando *split.abund* de Mothur.

⁹ El término *k-mero* hace referencia a fragmentos de tamaño k en los que se divide una secuencia de DNA.

Mediante el comando *classify.otu* se clasificó y asignó la taxonomía consenso de cada OTU. A continuación, se construyó una tabla en la se registra el número de veces que aparece cada OTU en cada una de las muestras estudiadas (también conocida como *tabla de OTUs*), gracias al comando *make.shared*. Finalmente, a partir de la tabla de OTUs y la taxonomía consenso correspondiente se obtuvo un archivo en formato biom con el comando *make.biom*. El archivo en formato fasta conteniendo la secuencia representativa de todos los OTUs del conjunto de datos fue también recuperado.

M.5.1.2.2. Procesamiento de datos obtenidos mediante plataforma MiSeq (Illumina)

Las lecturas generadas con la plataforma MiSeq de Illumina fueron procesadas mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas.

La empresa que llevó a cabo la secuenciación masiva realizó el *demultiplex* de las muestras, por lo que proporcionó directamente las lecturas separadas según la muestra de la que procedían. Concretamente por cada una de las muestras secuenciadas, se recibieron dos archivos en formato fastq¹⁰ correspondientes a las dos lecturas pareadas (denominadas R1 y R2) características de esta plataforma de secuenciación.

En primer lugar se analizó la calidad de las lecturas R1 y R2 de cada una de las muestras en estudio. Para ello, haciendo uso del software FastQC versión 0.11.5 (Andrews, 2010) en la distribución Ubuntu se comprobó el valor de calidad *Q score* de cada uno de los nucleótidos que componen las lecturas, registrando para cada posición el valor medio de calidad de todas las secuencias. Dado que la calidad de las lecturas R1 y R2 tiende a descender conforme aumenta la longitud de las mismas, para poder solapar lecturas R1 y R2 de calidad fue necesario eliminar los fragmentos finales de todas las lecturas. Teniendo en cuenta los valores promedio de *Q score* registrados se procedió a eliminar aquellos fragmentos de menor calidad de las lecturas, procurando conservar las regiones con mayor valor *Q score* asociado con las que garantizar un solapamiento de al menos 40 nucleótidos. Para ello se empleó el software FASTX Toolkit version 0.0.14 (FASTX-Toolkit, 2009) y se ejecutó el *script fastx_trimmer* (incluido en la propia herramienta) en la distribución Ubuntu de Linux, ajustando las opciones de cada argumento según los requerimientos específicos. Concretamente, se retuvieron los

¹⁰ El formato fastq es un formato de texto en el que se almacena toda la información generada por las plataformas de secuenciación de Illumina. Los archivos en formato fastq contienen la secuencia nucleotídica de la lectura en concreto, así como un valor de calidad de cada uno de los nucleótidos que la conforman, denominado *Phred quality score* o *Q score* (puntuación de calidad Phred o Q). Dichos valores de calidad se encuentran codificados en el sistema de codificación de caracteres ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*, Código Americano Estándar para el Intercambio de Información) y son calculados conforme la siguiente definición:

$$Q\ score = -10 \cdot \log_{10} P$$

Donde *P* es la probabilidad de que un determinado nucleótido sea asignado erróneamente. Así, un valor Q30 supone una probabilidad de error de 0.001 (introducción de un nucleótido erróneo en una posición concreta de la secuencia por cada 1000 veces que dicha posición fuera leída). Así pues, en el procesamiento bioinformático de secuencias está generalmente aceptado un valor Q30 como punto de referencia de calidad (Illumina, 2011).

primeros 260 nucleótidos de las lecturas R1 y los 200 nucleótidos iniciales de las lecturas R2, asegurando valores de *Q score* superiores a 19 y 20, respectivamente.

Las lecturas R1 y R2 obtenidas para cada muestra fueron entonces solapadas utilizando el *script* fastq-join (disponible en <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils/blob/wiki/FastqJoin.md>). Se especificó la opción concreta de cada argumento de tal forma que se estableció un tamaño de solapamiento de 40 nucleótidos permitiéndose hasta un 15% de *mismatches* entre R1 y R2 en la zona solapante.

Una vez solapadas las lecturas, los archivos generados en formato fastqjoin fueron procesados con el software SEED 2 desarrollado por Větrovský y colaboradores (2018). Se trata de una plataforma completa que reúne múltiples herramientas bioinformáticas externas con las que procesar completamente datos de secuenciación de amplicones en un entorno gráfico. Dicho programa fue empleado en el sistema operativo Windows de 64 bits.

Inicialmente se realizó un filtrado por calidad, comenzando por descartar todas aquellas secuencias cuyo valor promedio *Q score* era inferior a 30. Además, con objeto de reducir el volumen de datos, se eliminaron las secuencias de longitud considerablemente diferente a la esperada. Por otro lado, se descartaron las lecturas que contenían ambigüedades en la secuencia, es decir, caracteres que no corresponden con ninguno de los cuatro nucleótidos que componen el DNA. El proceso de filtrado además incluyó la eliminación de aquellas secuencias que contenían al menos un nucleótido con un *Q score* registrado inferior o igual a 10.

Seguidamente se eliminaron las secuencias de los *primers* empleados para la secuenciación por síntesis, las cuales a su vez poseían ciertas degeneraciones. Cabe destacar que para la eliminación de cada uno de los *primers* se permitió como máximo la presencia de dos *mismatches* respecto a la secuencia de los mismos.

Una vez limpiadas las secuencias y a partir del correspondiente archivo en formato fasta, se procedió a la obtención de secuencias únicas mediante el comando *unique.seqs* de Mothur, tal y como se describe en el Apartado M.5.1.2.1. Una vez reducido el volumen de datos, mediante la ejecución de la orden *chimera.vsearch* de Mothur se ejecutó el software externo VSEARCH version 2.8.0 (disponible en <https://github.com/torognes/vsearch>) para la detección de quimeras. Concretamente, las quimeras fueron detectadas utilizando como referencia la base de datos Gold de SILVA (Quast *et al.*, 2013), y posteriormente eliminadas gracias al comando *remove.seqs* de Mothur.

Cuando las quimeras fueron eliminadas, se ejecutó la orden *deunique.seqs* de Mothur, opuesta a la anteriormente citada *unique.seqs*. De esta forma, se incluyó en el conjunto total de datos aquellas secuencias idénticas a todas las no quiméricas.

El *clustering* o agrupamiento en OTUs al 3% de distancia de las secuencias libres de quimeras se realizó con el software SEED 2. En concreto se hizo uso del algoritmo UPARSE que forma parte de la herramienta externa USEARCH versión 8.1.161 (Edgar, 2013). Para formar los OTUs, dicho algoritmo se basa en la asunción de que la probabilidad de que las lecturas más abundantes correspondan a secuencias biológicas

reales es mayor que la correspondiente probabilidad de las secuencias minoritarias (Huse *et al.*, 2010; Edgar *et al.*, 2011).

Para poder clasificar los OTUs fue necesario previamente obtener la secuencia representativa de cada uno de ellos. Así pues, la secuencia más abundante de cada uno de los clusters (OTUs) fue considerada como la representante. Dichas secuencias fueron extraídas del conjunto de datos y se procedió a su clasificación empleando la herramienta Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Concretamente se ejecutó la orden *classify.seqs* empleando la base de datos del RDP version 16.02_20_16 (Cole *et al.*, 2014) y los parámetros descritos en el Apartado M.5.1.2.1. Una vez obtenida la clasificación taxonómica de los OTUs, se eliminaron todos aquellos clasificados como cloroplastos, mitocondrias u organismos eucariotas. La clasificación definitiva fue fusionada a la tabla de OTUs que se obtuvo en SEED 2 y de forma paralela se recuperó el archivo en formato fasta que contenía la secuencia representativa de cada uno de los OTUs.

Según Bokulich y colaboradores (2013), para poder normalizar los errores per-PCR y de secuenciación y reducir la subsecuente sobreestimación de diversidad, en los casos en los que se utilizan las plataformas de Illumina es necesario realizar un paso adicional de filtrado. Dichos autores instan a incluir en los *run* de secuenciación *mock communities*, esto es, DNA de comunidades bacterianas de composición y estructura predefinidas que sirve como patrón interno de la secuenciación. En su defecto, los autores recomiendan eliminar aquellos OTUs que se encuentran representados por menos de un 0.005% de secuencias respecto al conjunto total de datos. Así pues, se procedió a aplicar el criterio de Bokulich y colaboradores (2013), eliminando además así los *singletons*.

M.5.2. Construcción de árboles filogenéticos

M.5.2.1. Árboles basados en un número reducido de secuencias

Para la construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias génicas obtenidas mediante tecnología Sanger, se incluyeron como referencia las secuencias correspondientes a las cepas tipo de las especies bacterianas filogenéticamente más próximas a las cepas en estudio, según el caso. Para ello, se realizó un alineamiento múltiple de todas ellas empleando el software informático CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997). Se calcularon las distancias nucleotídicas según el modelo de Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980) y los árboles filogenéticos fueron inferidos a partir de estas utilizando el algoritmo Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) implementado en el paquete MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Los valores de confianza de los nodos se obtuvieron tras realizar 1000 réplicas de análisis *bootstrap*.

M.5.2.2. Árboles basados en un número elevado de secuencias

La construcción de árboles filogenéticos basados en las secuencias de los amplicones del gen *rrs* se fundamentó en primera instancia en la realización de un alineamiento múltiple de las mismas empleando la herramienta MAFFT v.7.040 (Katoh y Standley, 2013). A continuación, el archivo en formato fasta del alineamiento obtenido fue introducido en el software FastTree v.2.1.3 (Price *et al.*, 2010), el cual a su vez fue ejecutado en Ubuntu 16.04.5 LTS. El árbol filogenético fue inferido mediante el algoritmo

Maximum Likelihood. Concretamente se empleó el modelo *GTR* (*Generalized Time-Reversible model*), y para optimizar el árbol se empleó la distribución *gamma* con la que explicar la tasa de evolución en cada posición del alineamiento (número de categorías discretas fijadas = 4) (Yang, 1994).

M.5.3. Construcción de dendrogramas

M.5.3.1. Dendrogramas elaborados a partir de perfiles RAPD

Las imágenes relativas a los geles de electroforesis fueron procesadas con el software GelCompar II de la plataforma BioNumerics v.0 (Applied Maths NV, Bélgica). Posteriormente, empleando el mismo programa informático, se construyó un dendrograma utilizando el método de agrupamiento jerárquico aglomerativo UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean*; Sokal y Michener, 1958), y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para el agrupamiento de los perfiles.

M.5.3.2. Dendrogramas basados en datos numéricos

Para la construcción de dendrogramas basados en datos numéricos, en primer lugar se calcularon las distancias euclídeas entre muestras en base a la variable considerada. Para ello, se empleó la función *dist()* del software R version 3.3.1 (R Development Core Team, 2016). Las muestras fueron seguidamente agrupadas en base a dichas distancias, empleando para ello la función *hclust()* de R, y el algoritmo de agrupamiento UPGMA.

M.5.4. Análisis ecológico de comunidades procariotas

Todos los análisis relativos a las comunidades procariotas (datos procedentes de secuenciación masiva) fueron abordados a un nivel de distancia genética del 3%, es decir, a nivel de OTU. A su vez, todos los análisis fueron realizados en el software R version 3.3.1 (R Development Core Team, 2016) mediante el uso de los diferentes paquetes y funciones que se indican. Adicionalmente y en los casos en los que los paquetes desarrollados hasta la fecha del análisis no cubrían las necesidades específicas, se desarrollaron manualmente *scripts* en base a funciones base ya implementadas en R y a la llamada de funciones externas incluidas en diferentes paquetes.

M.5.4.1. Curvas de rarefacción y cálculo de la Cobertura de Good

Con el objetivo de saber si el esfuerzo de muestreo realizado fue suficiente para obtener muestras representativas de la comunidad procariota original, se representaron las curvas de rarefacción para cada muestra. Dichas curvas – también conocidas como *curvas de esfuerzo* – fueron obtenidas a partir de las correspondientes tablas de OTUs y mediante el empleo de la función *rarecurve()* implementada en el paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.*, 2016). Dicha función proporciona el valor de riqueza esperada $E(S_n)$ para submuestras de un tamaño concreto realizadas aleatoriamente (Hurlbert, 1971), el cual a su vez es calculado conforme a la Ecuación 2:

$$E(S_n) = \sum_{i=1}^N \left[1 - \frac{\left(\frac{N-N_i}{n} \right)}{\left(\frac{N}{n} \right)} \right] \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde N es el número de individuos de una muestra o comunidad concreta, N_i el número de individuos de la especie i^a , y n el número de individuos seleccionados aleatoriamente de la submuestra generada aleatoriamente.

Por otro lado, se calculó el parámetro de cobertura de Good (Good, 1953) para cada muestra. Este valor fue calculado manualmente en el programa informático R a partir de su definición (Ecuación 3) al no encontrarse incluido en ningún paquete específico, y expresado porcentualmente.

$$\text{Cobertura de Good} = \left[1 - \left(\frac{n}{N} \right) \right] \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde n hace referencia al número *singletons* y N al número de secuencias totales de la muestra en estudio.

M.5.4.2. Estudio de la diversidad alfa (α)

Puesto que las medidas de diversidad α son sensibles a la profundidad de muestreo (Ortiz-Álvarez *et al.*, 2018), previamente se normalizó el tamaño de todas las muestras. Para ello, se realizó un submuestreo de las mismas mediante la función *rarefy_even_depth()* del paquete phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013), seleccionando N secuencias de cada una de ellas de forma aleatoria, siendo N el número de secuencias registrado para la muestra más pequeña. Una vez que el tamaño de las muestras era uniforme, se procedió al cálculo de los diferentes índices de diversidad α . En primer lugar se calculó el estimador de riqueza (número de especies) no paramétrico Chao1 (Chao, 1984) conforme a la Ecuación 4:

$$\text{Chao1} = S + \frac{2a}{2b} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde S representa el número de especies presentes en una muestra, a hace referencia al número de *singletons* y b al de *doubletons* (especies representadas por dos secuencias en dicha muestra).

El estimador de Shannon (H' ; Shannon y Weaver, 1949), el cual tiene en cuenta tanto la abundancia relativa de las especies como el número individuos de cada una de ellas, fue calculado en base a la Ecuación 5.

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde p_i es la abundancia relativa de la especie i^a , y S el número de especies presentes en la muestra concreta. Este índice permite cuantificar el nivel de incertidumbre al predecir una especie cuando un individuo es seleccionado aleatoriamente de una comunidad concreta. Los autores defienden que cuanto mayor sea la riqueza de una comunidad y más equitativamente estén representados los individuos en la misma, más difícil es realizar correctamente dicha predicción.

Para medir la proporción de la diversidad observada respecto a la diversidad máxima posible de una muestra, se calculó el índice de equidad de Pielou (J' ; Pielou

1969, 1975). Teniendo en cuenta la definición del estimador H' (Ecuación 5), el índice J' se calculó siguiendo la Ecuación 6:

$$J' = \frac{H'}{\ln S} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Este índice que fue calculado manualmente al no encontrarse incluido en el paquete de R mencionado, permite conocer la uniformidad de la distribución de las especies que componen una muestra.

Por otro lado, teniendo en cuenta la definición del índice de Simpson original (D ; Simpson, 1949; Magurran, 2004) detallada en la Ecuación 7 se calculó el Inverso de Simpson ($1/D$).

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad (\text{Ecuación 7})$$

De esta forma, el índice de Simpson representa la probabilidad de seleccionar al azar dos individuos de una muestra que pertenezcan a la misma especie, siendo el Inverso de Simpson equivalente al número de especies igualmente comunes que producen el índice D observado. El Inverso de Simpson es un índice estable e independiente del número de secuencias de las muestras.

M.5.4.3. Estudio de la diversidad beta (β)

M.5.4.3.1. Consideraciones previas

McMurdie y Holmes (2014) destacan que la normalización de los datos al tamaño muestral más pequeño conduce a la pérdida de sensibilidad de los posteriores análisis estadísticos debido a la eliminación de una parte de los datos. Este mismo hecho lleva a un incremento del error de Tipo II, pero además supone un aumento de la tasa de falsos positivos (error de Tipo I) en los test destinados a detectar una abundancia diferencial de los taxones entre diferentes muestras. La normalización únicamente es útil en los casos en los que se dispone de muestras de pequeño tamaño (< 1000 secuencias por muestra) y conjuntos de datos de tamaño muy dispar, es decir, siendo el tamaño de la muestra más grande 10 veces superior a la de la muestra más pequeña (Weiss *et al.*, 2017). Por lo tanto, para el resto de análisis de diversidad y estudio de los perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas rizosféricas se emplearon todas las muestras en su totalidad y no los datos normalizados.

Por otro lado, según Anderson y Willis (2003) los análisis ecológicos multivariantes deben abordar habitualmente cuatro aspectos fundamentales: es preciso llevar a cabo (i) una ordenación no restringida (*unconstrained*) de los datos mediante PCoA (*Principal Coordinates Analysis*, Análisis de coordenadas principales) o NMDS (*Nonmetric MultiDimensional Scaling*, escalamiento no métrico multidimensional); (ii) realizar un análisis de restricción (*constrained*) conforme a una hipótesis específica, por ejemplo mediante CAP (*Canonical Analysis of Principal coordinates*; Análisis canónico de coordenadas principales); (iii) contrastar estadísticamente y de forma rigurosa dicha hipótesis y (iv) caracterizar o identificar aquellos taxones responsables

de los efectos observados o de los patrones multivariantes obtenidos. Para que los resultados obtenidos sean interpretables, dichos autores recomiendan que los análisis de restricción y no restringidos sean realizados empleando en ambos casos la misma medida de distancia, método de transformación o estandarización.

M.5.4.3.2. Cálculo de distancias entre muestras: distancia Weighted UniFrac

El componente beta de la diversidad biológica puede definirse como la variabilidad encontrada entre las comunidades que componen diferentes muestras, la cual puede ser medida gracias a diferentes métricas.

Entre las medidas de diversidad β usualmente empleadas en los estudios de ecología microbiana, se seleccionó la variante cuantitativa de la medida *Unique Fraction* o UniFrac (Lozupone y Knight, 2005), es decir, Weighted UniFrac (Lozupone *et al.*, 2007). La métrica UniFrac mide la distancia entre las comunidades que caracterizan las diferentes muestras como la fracción de la longitud de las ramas de un árbol filogenético en las que se sitúan los taxones presentes de forma exclusiva en una muestra u otra, pero no de aquellos presentes en ambas. Es decir, esta medida de distancia muestra la proporción relativa de la evolución de las regiones hipervariables del gen *rrs* estudiadas que es única de cada muestra (y que por tanto probablemente represente una adaptación de los individuos a cada ambiente concreto). De forma aproximada, el cálculo de la distancia entre todas las parejas de muestras se calcula de la siguiente manera. En primer lugar se obtiene un árbol filogenético en el que se incluyen todos los taxones, considerándose aquellas ramas del árbol que conducen a taxones detectados en una sola muestra como *ramas únicas (Unique Fraction)*, y aquellas en las que sitúan los taxones presentes en varias muestras como *ramas compartidas*. La distancia entre dos muestras es por tanto equivalente al cociente entre la suma de la longitud de las *ramas únicas* y la suma de la longitud de las *ramas únicas* y las *ramas compartidas*.

Por el contrario, la variante cuantitativa Weighted UniFrac le otorga un peso a cada rama del árbol en función de la abundancia relativa de los correspondientes taxones. Así pues, se trata de una medida de distancia que tiene en cuenta tanto la relación filogenética de los taxones que componen las muestras como su abundancia relativa.

A partir del árbol filogenético generado según se detalla en el Apartado M.5.2.2, la tabla de OTUs y la tabla de metadatos (tabla en la que se incluyen las características propias de cada muestra), se calculó la distancia entre muestras con la función *UniFrac()* del paquete *phyloseq* de R (McMurdie y Holmes, 2013).

M.5.4.3.3. Métodos exploratorios: ordenación multivariante mediante análisis de coordenadas principales (PCoA, *Principal Coordinates Analysis*)

Para poder visualizar la posible existencia de patrones multivariantes o agrupaciones de muestras en el conjunto de datos estudiado, se llevaron a cabo ordenaciones de los datos en el espacio multivariante.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) o escalamiento multidimensional métrico es un método que permite visualizar posibles agrupaciones de muestras en base a una medida de disimilaridad entre las comunidades procariotas que caracterizan las muestras. Se trata de un método sin restricciones, por lo que no parte de una hipótesis previa ni proporciona una conexión directa entre las coordenadas y las variables originales. El algoritmo trata de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos en el espacio de ordenación, procurando a su vez maximizar la varianza explicada por los ejes (Ramette, 2007). Si bien los ejes no son construidos teniendo en cuenta variables ambientales, los métodos exploratorios pueden mostrar gradientes ambientales subyacentes que determinan la separación de las muestras en el espacio de ordenación.

Puesto que este algoritmo puede trabajar con cualquier tipo de matriz de distancia, la ordenación de las muestras fue calculada gracias a la función *ordinate()* del paquete phyloseq de R (McMurdie y Holmes, 2013) en base a las distancias Weighted UniFrac previamente calculadas (Apartado M.5.4.3.2.).

M.5.4.3.4. Métodos interpretativos

Las ordenaciones de restricción o restringidas (*constrained ordinations*) permiten identificar si existen gradientes en la ocurrencia de los individuos de la comunidad, debidas a una combinación de variables ambientales. Así pues, los métodos de restricción relacionan una matriz compuesta por variables respuesta o dependientes (e.g., la abundancia relativa de cada taxón) con variables explicativas, también conocidas como variables independientes o predictivas (e.g., variables ambientales). Es decir, dichos métodos permiten generar un gráfico de ordenación partiendo de una hipótesis previa, representada por un modelo matemático de combinación de variables ambientales.

El objetivo perseguido por estos métodos es encontrar una función matemática que relacione la composición de las comunidades en estudio, con variables ambientales medidas. A continuación es preciso determinar estadísticamente si la relación encontrada es real o es producida únicamente por azar (Anderson y Willis, 2003; Ramette, 2007). En este trabajo se consideró como variables explicativas o ambientales los factores fisicoquímicos del suelo bajo la influencia de las raíces de roble melojo (Apartado M.3.), mientras que las variables dependientes correspondieron a la abundancia de los OTUs de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*.

M.5.4.3.4.1. Adaptación de variables ambientales para análisis de restricción

En primer lugar, tal y como recomendaban Clarke y Ainsworth (1993), los valores de concentración de los minerales P y K expresados en partes por millón (ppm) fueron transformados aplicando el logaritmo neperiano. Además, se calculó la textura de cada suelo a partir del contenido de arena, arcilla y limo siguiendo la Ecuación 8 (Crowther *et al.*, 2014).

$$\text{Textura} = \frac{\text{Arena (\%)}}{\text{Arcilla (\%)} + \text{Limo (\%)}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

M.5.4.3.4.2. Identificación de variables ambientales colineales

Cuando varias variables predictivas se encuentran correlacionadas y unas pueden ser predichas a partir de otras, se dice que se trata de variables colineales. El estudio de estas puede ser complejo ya que el efecto sobre las variables respuesta puede ser debido a una relación sinérgica real entre dichas variables, o bien verse enmascarado por falsas correlaciones (Graham, 2003). Puesto que las variables ecológicas con frecuencia son colineales, algunos autores sugieren eliminar de los análisis aquellas que pueden ser calculadas a partir de otras. Para ello, es posible determinar el valor del factor de inflación de la varianza (VIF, *Variance Inflation Factor*). Se trata de un parámetro que refleja qué parte de la varianza de una variable concreta es explicada por el resto de las variables independientes debido a la correlación entre ellas. Algunos autores consideran que cuando el valor VIF asociado a una variable es superior a 10 existe redundancia en las variables explicativas y esta puede calcularse mediante combinación de otras. Por lo tanto, las variables cuyo valor de VIF sea superior a 10 deben ser eliminadas de los modelos matemáticos (Neter *et al.*, 1996; Chatterjee *et al.*, 2000).

Así pues, se siguió un procedimiento de selección escalonada de aquellas variables que presentaban baja o nula colinealidad. Para ello, inicialmente se calculó el valor VIF de todas las variables ambientales medidas, a través de la función *vif.cca()* implementada en el paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.*, 2016), y se eliminó aquella para la cual se registró el mayor valor VIF, si este era superior a 10. A continuación se recalcularon nuevamente los valores VIF para todas las variables explicativas restantes y se eliminaron sucesivamente aquellas colineales hasta que el mayor valor VIF registrado era inferior a 10.

M.5.4.3.4.3. Análisis canónico de coordenadas principales (CAP, *Canonical Analysis of Principal coordinates*)

Uno de los métodos que permiten analizar si existe relación entre la variabilidad observada en las variables respuesta y la correspondiente a las variables explicativas, es el análisis canónico de coordenadas principales (CAP; Anderson y Willis, 2003). Al igual que ocurre con otros métodos de constricción como el análisis de correspondencias canónicas (CCA, *Canonical Correspondence Analysis*), el análisis multivariante de las variables respuesta es restringido por las explicativas. De esta forma, la ordenación obtenida únicamente muestra la variación que puede ser explicada por las variables explicativas (Paliy y Shankar, 2016). Debido a las ventajas que el CAP presenta respecto a otras herramientas no canónicas tradicionalmente empleadas en los análisis de comunidades microbianas, se seleccionó esta alternativa como método interpretativo. A diferencia de otros análisis de constricción ampliamente utilizados en estudios ecológicos como el CCA, este método no se basa en una relación previamente fijada entre las variables dependientes e independientes y además permite utilizar cualquier medida de distancia entre muestras (Anderson y Willis, 2003).

Para realizar el análisis CAP se empleó la función *ordinate()* del paquete *phyloseq* de R (McMurdie y Holmes, 2013) especificando el método de ordenación seleccionado y la medida de distancia a partir de la cual realizar la ordenación (Weighted UniFrac). En este caso además fue necesario indicar el modelo para constreñir las

variables respuesta, para lo cual se tuvieron en cuenta únicamente aquellas variables ambientales que previamente mostraron nula colinealidad (véase Apartado M.5.4.3.4.2.).

La significación estadística del modelo propuesto fue evaluada mediante un test de permutación similar a ANOVA con la función *anova()*¹¹, especificando la opción *terms* en el argumento *by* cuando se determinó la significación de cada uno de los factores fisicoquímicos estudiados. En ambos casos los test se realizaron con 9999 permutaciones.

M.5.4.4. Análisis estadístico de la homogeneidad de la dispersión multivariante (PERMDISP2)

Para poder inferir si existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la dispersión multivariante entre las muestras, se aplicó el test estadístico PERMDISP2 desarrollado por Anderson (2006). Se trata de un test permutacional con el que se pretende comprobar si la dispersión media de los grupos de puntos observados en el espacio multivariante (con respecto al centroide del grupo correspondiente) es equivalente entre todos los grupos de puntos. Por lo tanto, la hipótesis nula a contrastar es que existe homogeneidad en la dispersión multivariante.

Se trata pues de una extensión multivariante del test de Levene de gran aplicabilidad en el análisis ecológico de comunidades. Ello es debido a que es un test robusto en el caso de conjuntos de datos donde el número de variables excede el número de observaciones, con abundantes ceros debido a la presencia de especies raras, y donde la distribución de la abundancia de especies es de marcada asimetría positiva, todas ellas propiedades que caracterizan a los datos relativos a comunidades microbianas de ecosistemas naturales. Además, con este método es posible utilizar cualquier tipo de medida de distancia (Anderson, 2006).

La dispersión de las muestras fue calculada empleando el test PERMDISP2 a través de la función *betadisper()* del paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2016), y en base a las distancias Weighted UniFrac calculadas anteriormente. Posteriormente se aplicó la función *permutest()* – que a su vez llama a la función *anova()* – para testar la significación del PERMDISP2 y comprobar la homogeneidad de la dispersión de las muestras.

M.5.4.5. Análisis multivariante no paramétrico permutacional de la varianza (PERMANOVA, *non parametric Permutational Multivariate Analysis of Variance*)

Para determinar si las diferencias observadas en la distribución de las muestras en los gráficos de ordenación eran estadísticamente significativas se aplicó el test PERMANOVA. Este test no paramétrico es habitualmente empleado en los análisis de

¹¹ Los autores del paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.*, 2016) no proporcionan el nombre exacto del test estadístico empleado, si bien aclaran que el nombre de la función *anova()* puede inducir a error. Concretamente Oksanen (2012) puntualiza que dicha función lleva a cabo “un test basado en permutaciones aunque los resultados son mostrados como en una tabla estándar de ANOVA”. Se trata de una variante de ANOVA, donde R automáticamente selecciona el tipo de variante según el resultado obtenido de la ordenación de constricción realizada.

datos ecológicos para determinar si existen diferencias significativas en el centroide de los grupos de puntos, para todos los grupos de muestras (Anderson, 2001; Anderson y Walsh, 2013). Mediante este método es posible descomponer la varianza en múltiples términos individuales y por ende conocer el efecto de diferentes factores en la separación de las muestras en el espacio multivariante. Por lo tanto, se trata de un test de especial utilidad en estudios en los que se miden simultáneamente múltiples variables potencialmente dependientes, como la abundancia de especies en una comunidad (Anderson, 2001). Otro de los aspectos que ponen de manifiesto el potencial de PERMANOVA en los estudios de ecología microbiana es el hecho de que este test puede ser aplicado a cualquier matriz de distancia y que la significación del mismo es calculada realizando múltiples permutaciones aleatorias de observaciones entre grupos.

En este caso, se empleó la función *adonis()* incluida en el paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2016) para ejecutar los test PERMANOVA a partir de la medida de distancia Weighted UniFrac, y empleando 9999 permutaciones para el cálculo de los p-valores.

Dado que en el momento de escritura de esta Tesis no han sido desarrollados test estadísticos *post-hoc* específicos a aplicar tras los análisis PERMANOVA, en aquellos casos en los que el test permutacional resultó significativo fue necesario realizar comparaciones de muestras dos a dos para poder determinar qué parejas de muestras mostraban diferencias significativas. La función *pairwise.adonis()* implementada en el paquete *pairwiseAdonis* (Martinez-Arbizu, 2017) realiza este tipo de comparaciones, sin embargo, dicha función no acepta distancias Weighted UniFrac. Puesto que los test PERMANOVA fueron calculados en base a dicha medida de distancia, se creó manualmente una función en R basada en *pairwise.adonis()* capaz de aceptar cualquier tipo de matriz de distancias a partir de la cual realizar los cálculos. Cabe destacar que además se corrigieron los p-valores mediante método de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) para controlar la tasa de detección de falsos positivos (error de Tipo I).

M.5.4.6. Definición del core procarioma de la rizosfera de roble melojo

Según Hernandez-Agreda y colaboradores (2017), el *core* microbioma se describe como el conjunto de microorganismos del microbioma de un hospedador que potencialmente le proporcionan funciones esenciales a este en el hábitat en el que se encuentra. Dichos autores remarcan que la consideración de un microorganismo como potencialmente transcendente no debe basarse exclusivamente en su abundancia relativa, sino que la ubicuidad del mismo y la persistencia de la asociación con el hospedador son factores clave en la identificación de microorganismos *core*. En este contexto, la persistencia de un taxón concreto se define como la proporción de muestras en las que dicho taxón se encuentra presente (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017).

A su vez, para la descripción del *core* procarioma asociado a un hospedador han de tenerse en consideración ciertos aspectos técnicos como la tecnología de secuenciación empleada y el nivel de replicación (entre otros) dado que la profundidad o esfuerzo de secuenciación influye en el número de taxones detectados. A la hora de asignar individuos al *core* microbioma, y en los casos en los que se emplea la plataforma 454 de secuenciación masiva, se recomienda utilizar un nivel de persistencia algo

conservativo (50-80%) para disminuir el efecto del esfuerzo de secuenciación, especialmente en los estudios que adolecen de un bajo nivel de replicación (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017). Por tanto, siguiendo las recomendaciones de dichos autores y de Delgado-Baquerizo y colaboradores (2018), en el presente estudio se consideraron OTUs del *core* procarioma rizosférico del roble melojo en condiciones naturales, todos aquellos OTUs que se encontraban en todos los sitios analizados (ubicuidad) y en al menos un 55.5% de las muestras (persistencia). Dicha asignación fue realizada tanto para las secuencias de DNA (*core*-DNA) como para las derivadas del RNA (*core*-RNA).

Posteriormente, se comparó el *core*-DNA y el *core*-RNA y se designó el *core*-compartido asignando al mismo aquellos OTUs que estaban presentes en ambos conjuntos. Para dichos OTUs, se calculó el ratio rRNA:rDNA como el cociente entre el porcentaje de secuencias derivadas del RNA (amplicones de las regiones hipervariables V3-V4-V5) y el porcentaje de las correspondientes secuencias detectadas en la librería de DNA.

M.5.4.7. Predicción de funciones de las comunidades procariotas rizosféricas

A partir de las tablas de OTUs y las correspondientes asignaciones taxonómicas es posible inferir las potenciales funciones desempeñadas por una comunidad procariota, por ejemplo, a través de la herramienta FAPROTAX (*Functional Annotation of Prokaryotic Taxa*; Louca *et al.*, 2016). Este sistema ha sido desarrollado para obtener una aproximación del perfil funcional de una determinada comunidad procariota a partir de su correspondiente asignación taxonómica, contribuyendo así a la interpretación ecológica de los datos generados mediante técnicas de secuenciación masiva como las aquí empleadas. Dicho sistema incluye una base de datos con aproximadamente 80 funciones relacionadas con el metabolismo, patogénesis vegetal y procesos ecológicos relevantes llevados a cabo por organismos procariotas, además de 7600 anotaciones funcionales que cubren aproximadamente 4600 taxones.

Para realizar la inferencia funcional, se empleó el *script collapse_table.py* incluido en FAPROTAX v 1.1. Dicho *script* compara los perfiles taxonómicos de una comunidad procariota con aquellos presentes en la base de datos antes mencionada. A cada taxón de la comunidad en estudio le asigna entonces las funciones que se encuentran previamente descritas en la base de datos para dicho taxón.

Por lo tanto, como dato de entrada se emplearon las tablas de OTUs (Apartado M.5.1.2.) incluyendo una columna relativa a la asignación taxonómica correspondiente. El *script* – escrito en el lenguaje de programación Python – fue ejecutado en distribución Ubuntu 16.04.5 LTS de Linux.

M.6. Técnicas microbiológicas

M.6.1. Microorganismos

Las cepas bacterianas, y del oomiceto y hongos empleados en este trabajo se indican en las Tablas M.9 y M.10, respectivamente.

Materiales y Métodos

Tabla M.9. Cepas bacterianas empleadas a lo largo de este trabajo.

Cepas bacterianas	Hospedador de origen	Características	Referencias
<i>Phyllobacterium endophyticum</i> PEPV15 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Solubilización de fosfato cálcico; producción de sideróforos <i>in vitro</i>	Flores-Félix <i>et al.</i> , 2013
<i>Achromobacter</i> sp. VPTA3	<i>Capsicum annuum</i>	Producción de IAA y ACC-deaminasa <i>in vitro</i> ; solubilización de sales de fosfato cálcico	Cepa cedida por Vicente Pérez Tapia ^a
<i>Paenibacillus polymyxa</i> PIC73	<i>Olea europaea</i>	Producción de proteasas y catalasa. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de varios hongos y oomicetos fitopatógenos, como <i>Phytophthora cinnamomi</i>	Gómez-Lama Cabanás <i>et al.</i> , 2018b
<i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	<i>Pisum sativum</i>	Nodulación de leguminosas de los géneros <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Pisum</i> , <i>Lens.</i>	Frank, 1889
<i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>trifolii</i> ATCC 14480	<i>Trifolium pratense</i>	Nodulación de leguminosas del género <i>Trifolium</i> .	Dangeard, 1926
Colección de aislados del género <i>Rhizobium</i>	<i>Lathyrus cicera</i> , <i>L. intricatus</i> , <i>Vicia sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i> , <i>V. disperma</i> , <i>Trifolium cherleri</i> o <i>T. glomeratum</i>	Aislados del interior de nódulos de los hospedadores originarios	Cepas aisladas en este trabajo
Colección de cepas del género <i>Pseudomonas</i>	<i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	Aislados del suelo rizosférico del hospedador de origen	
Colección de cepas del género <i>Luteibacter</i>	<i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	Aislados del interior de la raíz del hospedador de origen	

^b Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Granada.

Tabla M.10. Cepas de hongos y del oomiceto empleadas en este trabajo.

Microorganismos	Hospedador de origen	Referencias
<i>Biscogniauxia mediterranea</i> 5	<i>Quercus suber</i>	Luque <i>et al.</i> , 2000
<i>Biscogniauxia mediterranea</i> 226	<i>Quercus ilex</i>	Cepa proporcionada por el Dr. Jordi Luque Font ^a
<i>Diplodia corticola</i> 58	<i>Quercus suber</i>	Luque <i>et al.</i> , 2002
<i>Diplodia corticola</i> 155	<i>Quercus ilex</i>	Cepa proporcionada por el Dr. Jordi Luque Font ^a
<i>Armillaria mellea</i> 860	<i>Prunus dulcis</i>	Cepa proporcionada por el Dr. Jordi Luque Font ^a
<i>Phytophthora cinnamomi</i> UEx1	<i>Quercus ilex</i>	Corcobado <i>et al.</i> , 2013

^a Programa Científico Protección Vegetal Sostenible, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Cabriels.

M.6.2. Medios de cultivo

Para el cultivo de los microorganismos se emplearon los medios¹² indicados a continuación tras esterilizarlos en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 min, salvo las excepciones que se detallan.

Tabla M.11. Composición del medio de cultivo LB.

Medio LB (<i>Luria-Bertani</i> ; Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	
Componentes	Cantidad
NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	Hasta 1 L

El pH fue ajustado a 7

Tabla M.12. Composición del medio de cultivo TY.

Medio TY (<i>Tryptone-Yeast</i> ; Beringer, 1974)	
Componentes	Cantidad
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua destilada	Hasta 1 L

El pH fue ajustado a 6.8.

¹² En los casos en los que el medio de cultivo correspondiente se empleó exclusivamente de manera sólida, se indica en la tabla la cantidad de agar añadida. Aquellos medios que fueron empleados tanto de forma líquida como sólida (según el ensayo considerado), no se detalla, y cuando hubo de solidificarse el medio, se añadió agar al 1.5% (p/v).

Tabla M.13. Composición del medio de cultivo YEM.

Medio YEM (<i>Yeast Extract Manitol</i> ; Vincent, 1970)	
Componentes	Cantidad
D-Manitol	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Agua destilada	Hasta 1 L

El pH fue ajustado a 6.8

Tabla M.14. Composición del medio de cultivo TSA.

Medio TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i> , Bacto Difco™ BD biosciences)	
Componentes	Cantidad
Digerido pancreático de caseína	17 g
Digerido enzimático de soja	3 g
D-Glucosa	2.5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Agar	18 g
Agua destilada	Hasta 1 L

El pH del medio se encuentra ajustado a 7.3 por el fabricante

Tabla M.15. Composición del medio de cultivo mineral salino.

Medio mineral salino (Eberspächer y Lingens, 2006)	
Componentes	Cantidad
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.7 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.7 g
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.033 g
Solución de elementos traza	1 mL
Vitamina B12 (0.03 mg/mL)	1 mL
Agua destilada	Hasta 1 L
Solución de elementos traza	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	400 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	400 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	40 mg
H ₃ BO ₃	500 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	200 mg
KI	100 mg
Biotina	100 mg
Agua destilada	Hasta 1 L
El pH fue ajustado a 7	

Tanto la solución de elementos traza como la solución acuosa de vitamina B12 fueron esterilizadas previamente por filtración empleando unidades Whatman® (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) de 0.2 µm de diámetro de poro. Ambas fueron añadidas al medio de cultivo una vez este fue esterilizado en autoclave y atemperado aproximadamente a 50 °C.

Tabla M.16. Composición del medio de cultivo DF modificado.

Medio DF (<i>Dworkin-Foster</i>) (<i>Dworkin y Foster, 1958</i>) modificado	
Componentes	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
Solución de elementos traza	1 mL
Agua destilada	Hasta 1 L
Solución de elementos traza	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	676 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	11 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	125 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	78 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	17 mg
Agua destilada	Hasta 1 L
El pH fue ajustado a 7	

La solución de elementos traza fue esterilizada previamente con unidades Whatman® (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) de 0.2 µm de diámetro de poro, y añadida al medio de cultivo una vez este fue esterilizado en autoclave y atemperado a aproximadamente 50 °C.

Medio CAS (*Chrome Azurol S*; Alexander y Zuberer, 1991)

El medio CAS fue preparado a partir de las cuatro soluciones indicadas en las Tablas M.17-20.

Tabla M.17. Composición de la Solución 1 constituyente del medio CAS.

Solución 1	
Componentes	Cantidad
FeCl ₃ ·6H ₂ O (1 mM) ^a	10 mL
CAS ^b (1.21 mg/ mL) ^c	50 mL
HDTMA ^d (1.82 mg/ mL) ^c	40 mL

^a Solución preparada en HCl 10 mM

^b CAS, *Chrome Azurol S*

^c HDTMA, *Hexadecyltrimethylammonium bromide*, bromuro de hexadecyltrimetilamonio

^d Solución preparada en agua destilada

Tabla M.18. Composición de la Solución 2 constituyente del medio CAS.

Solución 2	
Componentes	Cantidad
KH ₂ PO ₄	0.3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
PIPES ^a	30.24 g
Agar	18 g
Agua destilada	Hasta 800 mL

^a PIPES, Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic) acid, ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)

El pH fue ajustado a 6.8

Tabla M.19. Composición de la Solución 3 constituyente del medio CAS.

Solución 3	
Componentes	Cantidad
D-Glucosa	2 g
D-Manitol	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	493 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.17 mg
H ₃ BO ₃	1.4 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.0 mg
Agua destilada	Hasta 70 mL

Tabla M.20. Composición de la Solución 4 del medio CAS.

Solución 4	
Componentes	Cantidad
Casaminoácidos	3 g
Agua destilada	30 mL

La Solución 4 fue esterilizada por filtración empleando unidades Whatman® (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) de 0.2 µm de diámetro de poro.

Una vez se esterilizaron y atemperaron todas las soluciones, se mezcló la Solución 3 con la 2. A la mezcla se le añadió la Solución 4, y finalmente se incorporó la Solución 1.

Tabla M.21. Composición del medio de cultivo NBRIP.

Medio NBRIP (<i>National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium</i> ; Nautiyal, 1999)	
Componentes	Cantidad
D-Glucosa	10 g
Sal cálcica de fosfato ^a	5 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
KCl	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
Agar	15 g
Agua destilada	Hasta 1 L

^a Se estudiaron dos fosfatos diferentes individualmente (CaHPO₄ o Ca₃(PO₄)₂), manteniendo el resto de componentes en idénticas concentraciones en ambos casos.
El pH fue ajustado a 7

Debido a la presencia de D-Glucosa en su composición, el medio NBRIP fue esterilizado en autoclave a 115 °C durante 30 min.

Tabla M.22. Composición del medio de cultivo YED-P modificado.

Medio YED-P (<i>Yeast Extract Dextrose-tricalcium Phosphate</i>) (Peix <i>et al.</i> , 2001) modificado	
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	5 g
D-Manitol	10 g
Sal cálcica de fosfato ^a	2 g
Agar	15 g
Agua destilada	Hasta 1 L

^a Se estudiaron dos fosfatos diferentes individualmente (CaHPO₄ o Ca₃(PO₄)₂), manteniendo el resto de componentes en idénticas concentraciones en ambos casos.

Para evitar la reacción de Maillard, este medio fue esterilizado en autoclave a 115 °C durante 30 min.

Tabla M.23. Composición del medio de cultivo YED-P doblemente modificado.

Medio YED-P (<i>Yeast Extract Dextrose-tricalcium Phosphate</i>) (Peix <i>et al.</i>, 2001) doblemente modificado	
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	0.5 g
D-Manitol	10 g
Sal cálcica de fosfato ^a	2 g
Agar	15 g
Agua destilada	Hasta 1 L

^a Se estudiaron dos fosfatos diferentes individualmente (CaHPO_4 o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), manteniendo el resto de componentes en idénticas concentraciones en ambos casos.

Para evitar la reacción de Maillard, este medio fue esterilizado en autoclave a 115 °C durante 30 min.

Tabla M.24. Composición del medio de cultivo CMC.

Medio CMC (<i>CarboxyMethylCellulose</i>; Kasana <i>et al.</i>, 2008)	
Composición	Cantidad
NaNO_3	2 g
K_2HPO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl	0.5 g
CMC (sal sódica de carboximetilcelulosa)	2 g
Peptona	0.2 g
Agar	15 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Tabla M.25. Composición del medio de cultivo SMA modificado.

Medio SMA (<i>Skimmed Milk Agar</i>; Naik <i>et al.</i>, 2008) modificado	
Componentes	Cantidad
Leche en polvo desnatada	50 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
D-Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Para evitar la coagulación de las proteínas de la leche, este medio fue esterilizado en autoclave a 115 °C durante 10 min.

Tabla M.26. Composición del medio de cultivo MEA.

Medio MEA (<i>Malt Extract Agar</i> ; Gutz y Doe, 1973)	
Componentes	Cantidad
Extracto de malta	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Tabla M.27. Composición del medio de cultivo ME.

Medio ME (<i>Malt Extract</i> ; medio MEA modificado)	
Componentes	Cantidad
Extracto de malta	20 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Tabla M.28. Composición del medio de cultivo PDA.

Medio PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i> ; Tournas <i>et al.</i> , 1998)	
Componentes	Cantidad
Almidón de patata	4 g
D-Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	Hasta 1 L

M.6.3. Aislamiento bacteriano

M.6.3.1. Aislamiento de bacterias del interior de nódulos de plantas leguminosas

Las raíces de las plantas hospedadoras fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada, y los fragmentos de raíz donde se hallaban los nódulos fueron seccionados con ayuda de una tijera. Cabe destacar que tan solo fueron recuperados aquellos nódulos de color rosáceo (aspecto indicativo de la presencia de leghemoglobina, y en consecuencia de la probable fijación activa de N atmosférico en el interior de los mismos; Wagner, 2011), descartando aquellos blanquecinos o senescentes.

Los nódulos fueron esterilizados superficialmente siendo sumergidos en un volumen de solución acuosa de HgCl_2 al 0.25% (p/v) tal que todos estuvieran cubiertos en su totalidad. Tras siete minutos, se procedió a lavarlos con agua destilada estéril cinco veces, y se depositaron separadamente en una placa Petri vacía. Allí, fueron triturados individualmente haciendo uso de varillas de vidrio previamente esterilizadas, y los lisados obtenidos fueron sembrados en medio de cultivo TY (Tabla M.12) con ayuda de las propias varillas.

Para comprobar el éxito de la esterilización superficial de los nódulos aislados de cada especie vegetal, se friccionó, en cada caso, un nódulo esterilizado sin triturar

sobre la superficie del medio de cultivo anteriormente citado. Todas las placas fueron incubadas a 28 °C durante 24-48 h.

M.6.3.2. Aislamiento de bacterias asociadas a la raíz de *Q. pyrenaica*

M.6.3.2.1. Bacterias rizosféricas

El aislamiento de bacterias que habitan la rizosfera de roble melojo fue llevado a cabo a partir del suelo rizosférico de los tres árboles muestreados en la parcela 1 en el sitio HAF (Apartado M.1).

Para ello, inicialmente se llevó a cabo un pre-enriquecimiento en el medio mineral salino descrito por Eberspächer y Lingens (2006) (Tabla M.15) y suplementado con diferentes fuentes de C. Se prepararon soluciones acuosas concentradas al 4% (p/v) de 1,2-dihidro-1,5-dimetil-2-fenil-3H-pirazol-3-ona (conocido como fenazona o antipirina), 4-dimetilamino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-one (aminofenazona o piramidón), L-fenilalanina y ácido tánico, todos ellos compuestos que incluyen al menos un anillo bencénico en su estructura. Las soluciones fueron posteriormente esterilizadas por filtración utilizando unidades Whatman® (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) de 0.2 µm de diámetro de poro y añadidas individualmente a matraces con 50 mL del medio citado, a una concentración final de 0.4% (p/v). A cada uno de los matraces se le añadió 5 g de la mezcla de suelo rizosférico, y se procedió a la incubación de los mismos a 30 °C en un agitador orbital (170 rpm) durante 7 días.

Transcurrido este periodo, se dejaron los matraces estáticamente en reposo durante 15 min para conseguir la deposición de las partículas más groseras del suelo en el fondo de los matraces. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de cada suspensión de suelo rizosférico en solución salina estéril (NaCl 0.9%, p/v), hasta la dilución 10⁻⁵. A continuación se sembraron 100 µL de cada una de las diluciones y de las suspensiones sin diluir, en medio mineral salino sólido suplementado con fenazona (0.2%, p/v), aminofenazona (0.2%, p/v), L-fenilalanina (0.2%, p/v) o ácido tánico (0.1%, p/v). Cabe destacar que para evitar el crecimiento fúngico, en todos los casos se añadió cicloheximida a una concentración final del 0.01% (preparada en etanol al 50%, v/v).

Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 10 días.

M.6.3.2.2. Bacterias endófitas de raíz de roble melojo

Las raíces de los árboles descuajados (ver Apartado M.2.3) fueron lavadas abundantemente con agua del grifo para eliminar el suelo adherido a las mismas, y posteriormente con agua destilada estéril. Con ayuda de una tijera se cortaron las raíces no suberificadas en fragmentos de aproximadamente 5 cm de longitud y se procedió a la esterilización en superficie de los mismos. Los fragmentos de raíz procedentes de los mismos árboles fueron esterilizados conjuntamente y de forma independiente a los fragmentos correspondientes al resto de árboles.

Las raíces fueron sumergidas en etanol al 96% (v/v) durante 1 min y posteriormente en una solución acuosa de NaClO al 5% (v/v) por un periodo de 15 min, realizando agitaciones periódicas. Tras eliminar la solución de NaClO, las raíces fueron sumergidas nuevamente en etanol (96%, v/v) durante 30 s, y se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril. Estas fueron cortadas en fragmentos más pequeños (5 mm

aproximadamente) con ayuda de un bisturí estéril, y algunos de ellos fueron friccionados por la superficie de los medios de cultivo TSA y YEM con el objetivo de comprobar el éxito de la esterilización superficial de las raíces.

0.2 g de los fragmentos restantes de raíz correspondientes a cada árbol fueron introducidos en tubos eppendorf estériles y estos a su vez en N líquido durante un instante. A continuación, en cada tubo se introdujeron tres bolitas de acero inoxidable de 5 mm de diámetro (Qiagen, Países Bajos) previamente esterilizadas en horno (160 °C, 2 h) y se procedió a la molienda de las raíces en el molino mezclador MM 031 (Retsch, Alemania), durante 6 min a 30 Hz. Una vez que el material vegetal se había convertido en un polvo fino, a cada tubo se le añadió 500 µL de tampón fosfato 100 mM pH 7.0 estéril (conteniendo KH_2PO_4 60 mM, K_2HPO_4 40 mM), y su contenido fue mezclado por inmersión.

Los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 2 min y a continuación se hicieron diluciones seriadas del sobrenadante en tampón fosfato hasta la dilución 10^{-2} . De cada dilución y del sobrenadante sin diluir se sembró por triplicado 100 µL en los medios de cultivo TSA y YEM. Todas las placas – incluidas aquellas destinadas a comprobar el éxito de la esterilización superficial de las raíces – fueron incubadas a 30 °C hasta la aparición de colonias bacterianas.

M.6.4. Mantenimiento y conservación a largo plazo de microorganismos

M.6.4.1. Cepas bacterianas

Para el crecimiento rutinario y mantenimiento de las cepas bacterianas que figuran en la Tabla M.9, se emplearon diferentes medios y condiciones de cultivo. Concretamente, para las cepas *Achromobacter* sp. VPTA3, *P. polymyxa* PIC73 y las cepas del género *Pseudomonas* se empleó el medio de cultivo LB. Por otro lado, las cepas del género *Rhizobium* y *P. endophyticum* PEPV15^T fueron habitualmente crecidas en medio TY, mientras que para las endófitas adscritas al género *Luteibacter* se empleó el medio YEM.

En las ocasiones en las que fue necesario obtener un cultivo líquido, las bacterias fueron crecidas en el correspondiente medio y mantenidas en oscuridad y agitación constante (170 ó 200 rpm, según el caso). El periodo de incubación se prolongó hasta alcanzar la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) en el espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia Biotech, EEUU) específica según los requerimientos del experimento concreto.

La temperatura habitual de crecimiento de todas las cepas tanto en medio sólido como líquido fue de 30 °C (salvo en las excepciones que se detallan), si bien aquellas pertenecientes al orden *Rhizobiales* fueron incubadas normalmente a 28 °C. Cabe mencionar que cuando fue necesario recuperar el *pellet* celular a partir de cultivos bacterianos de cepas productores de abundante exopolisacárido, este fue tratado con sal sódica de N-laurilsarcosina al 0.1% (p/v) preparada en tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8). El uso de dicho surfactante aniónico persigue la reducción de la mucosidad bacteriana y un aumento de la permeabilidad de las membranas plasmáticas.

Para su conservación a largo plazo, todas las cepas bacterianas fueron crecidas en 3 mL del medio correspondiente tal y como se ha mencionado, hasta alcanzar un

valor de DO_{600} de 0.8 unidades. Posteriormente, se añadió en criotubos estériles 750 μ L de cada cultivo bacteriano y 250 μ L de glicerol previamente esterilizado, como agente crioprotector. La operación fue realizada por duplicado, y los dos criotubos de cada cepa fueron almacenados a -80°C .

M.6.4.2. Cepas de hongos y oomiceto

Las cepas de las especies *B. mediterranea*, *D. corticola* y *P. cinnamomi* fueron crecidas de forma rutinaria en el medio PDA (Tabla M.28) e incubadas a 25°C , mientras que para el crecimiento de la cepa correspondiente a la especie *A. mellea* se empleó el medio MEA (Tabla M.26) y la misma temperatura de incubación.

Una vez que los hongos de las especies *B. mediterranea* y *D. corticola* habían esporulado, se procedió a la conservación a largo plazo de suspensiones de esporas obtenidas para cada uno de ellos. Para ello, se añadió 10 mL de agua destilada estéril sobre toda la superficie del medio de cultivo con crecimiento de cada uno de los hongos, y se friccionó el micelio cuidadosamente con ayuda de una espátula estéril. Las suspensiones de esporas obtenidas fueron filtradas en condiciones de esterilidad haciéndolas pasar por una capa de aproximadamente 0.5 cm de espesor de algodón estéril acoplado previamente en el fondo de una jeringa Injekt® de 12 mL (B. Braun, Alemania). De esta forma, las suspensiones de esporas fueron recogidas en tubos falcon, quedando el micelio fundamentalmente retenido en los filtros de algodón. A continuación, los filtrados fueron centrifugados durante 10 min a 6400 rpm y los *pellet* obtenidos fueron resuspendidos en 1 mL de agua destilada estéril. A las suspensiones acuosas de esporas se les añadió 1 mL de glicerol estéril (50%, v/v), y las alícuotas de 200 μ L en las que se fraccionaron las mezclas se almacenaron a -80°C .

Para la conservación a largo plazo de *P. cinnamomi* y *A. mellea*, con ayuda de un sacabocados estéril de 0.6 cm de diámetro se obtuvieron discos de agar con crecimiento activo de los respectivos organismos. Estos fueron colocados sobre la superficie de los medios PDA y MEA, respectivamente, en pico de flauta. Los tubos con agar inclinado fueron entonces incubados a 25°C en estático, hasta que el micelio había cubierto gran parte de la superficie del pico de flauta. Posteriormente, se añadió parafina líquida previamente esterilizada en horno (160°C , 2 h) de tal forma que el pico de flauta, y por ende, todo el micelio del hongo, quedaron cubiertos e impermeabilizados completamente. Se generaron hasta seis réplicas por cada especie, y todos los tubos fueron almacenados en oscuridad a temperatura ambiente hasta su nuevo uso.

M.6.5. Obtención de inóculos bacterianos

Las cepas bacterianas fueron crecidas en los medios líquidos y condiciones de cultivo rutinarias según el género bacteriano en estudio (ver Apartado M.6.4.1) hasta alcanzar un valor de DO_{600} de 0.8 unidades.

A continuación se recuperó 1 mL de cada cultivo en tubos eppendorfs, y estos fueron centrifugados dos veces a 8000 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad, y las células fueron resuspendidas cuidadosamente en el volumen de solución salina estéril (NaCl 0.9%, p/v) necesario para alcanzar la DO_{600} requerida en cada experimento concreto.

M.6.6. Caracterización *in vitro* de las actividades relacionadas con la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal

El potencial bacteriano de promover el crecimiento vegetal directa e indirectamente fue evaluado en base al conjunto de técnicas que a continuación se detallan.

M.6.6.1. Métodos cualitativos y semicuantitativos

M.6.6.1.1. Evaluación de la producción de sideróforos

Con el objetivo de detectar si las cepas en estudio son capaces de producir moléculas quelantes de Fe^{3+} , se llevó a cabo un ensayo cualitativo basado en aquel descrito por Schwyn y Neilands (1987). Concretamente, se evaluó el cambio de coloración que se produce cuando un agente quelante secuestra el ion férrico de un compuesto ternario formado por este, un colorante y un surfactante catiónico, y tiene lugar la liberación del colorante libre. En este caso se empleó el medio CAS descrito por Alexander y Zuberer (1991) (Apartado M.6.2.) el cual cambia de coloración de azul (estado en el que el complejo ternario compuesto por el colorante CAS, el Fe^{3+} y el surfactante HDTMA se encuentra formado), a naranja en el caso de la producción de sideróforos. La Figura M.4 ilustra el mecanismo de funcionamiento del medio CAS.

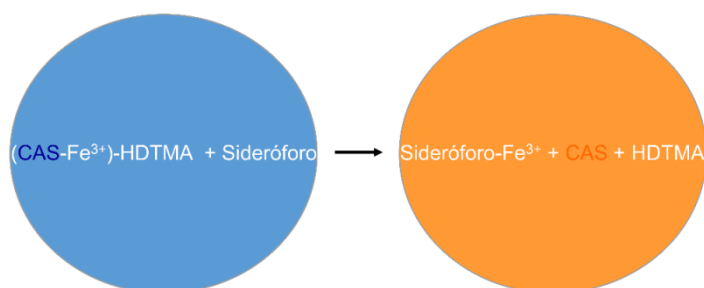


Figura M.4. Representación del comportamiento del medio CAS en presencia de sideróforos. Cuando un sideróforo acompleja el Fe^{3+} del complejo CAS- Fe^{3+} estabilizado por el surfactante HDTMA, se libera el colorante CAS produciéndose un cambio de color desde azul hacia naranja.

Los inóculos de cada una de las cepas fueron preparados tal y como se especifica en el Apartado M.6.5., sembrándose una gota de 10 μL por cada cepa en el medio CAS. Las condiciones de incubación de las placas Petri fueron las indicadas en el Apartado M.6.4.1.

En aquellos casos en los que las bacterias no fueron capaces de crecer en el medio CAS, la evaluación de la producción de sideróforos se realizó siguiendo dos estrategias distintas:

Por un lado, se siguió el procedimiento propuesto por Milagres y colaboradores (1999), basado en la realización de una escisión sobre el medio CAS a lo largo de todo el diámetro de la placa, con ayuda de un bisturí estéril. Una de las mitades fue descartada, y el espacio libre restante de la placa fue rellenado con 15 mL de medio YEM a aproximadamente 40 °C (Tabla M.13). Una vez solidificado, se dispuso una gota de 5 μL de cada uno de los inóculos previamente preparados en el medio YEM,

concretamente en la zona próxima al límite entre ambos medios de cultivo (Figura M.5A). A este método de siembra se le denominó *siembra en media placa*.

La segunda estrategia consistió en realizar con un sacabocados estéril de 1.5 cm de diámetro orificios en el medio CAS, los cuales fueron posteriormente rellenados con 350 μL de medio YEM a aproximadamente 40 °C (*siembra en orificios*). Cuando este había solidificado, cada orificio con medio YEM fue inoculado con 20 μL de cada inóculo previamente obtenido (Apartado M.6.5.). En la Figura M.5B se muestra el procedimiento seguido para la siembra en orificios.

En ambos dos casos, la valoración visual de la aparición de zonas anaranjadas próximas a las colonias bacterianas fue realizada periódicamente durante 15 días.

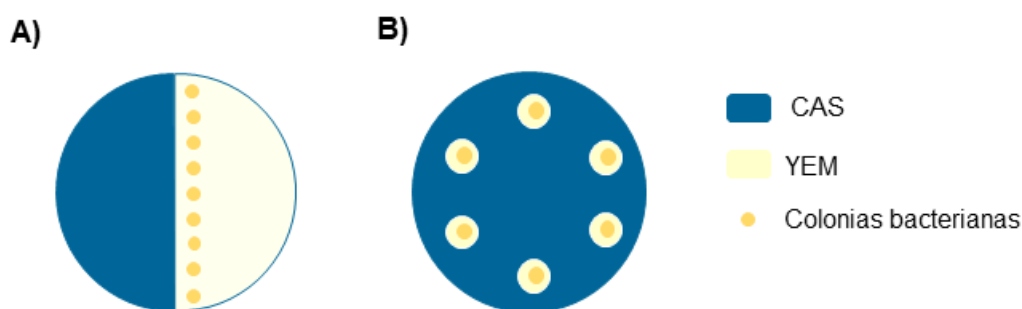


Figura M.5. Representación de la estructura de las placas empleadas para el ensayo de detección de sideróforos mediante el empleo de dos medios de cultivo. A) Siembra en media placa y siembra en orificios (B).

M.6.6.1.2. Evaluación de la solubilización de fosfato inorgánico

Las sales cálcicas de ácido fosfórico son minerales altamente insolubles cuya solubilización conduce a la aparición de una zona de aclaramiento adyacente en el medio del cultivo donde esto ocurre.

Por lo tanto, para estudiar la capacidad bacteriana de solubilizar CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se dispusieron gotas de 10 μL del inóculo de cada cepa sobre los medios NBRIP, YED-P modificado y YED-P doblemente modificado (ver Apartado M.6.2.).

La incubación de las placas se realizó a 30 °C durante 7-14 días en función de la cepa en estudio, realizando lecturas periódicas de las placas y calculando el índice de actividad conforme se describe en el Apartado M.6.6.1.8.

M.6.6.1.3. Evaluación de la actividad CMC-asa o actividad endocelulolítica

La capacidad de degradar celulosa carboxilada soluble fue testada siguiendo el procedimiento descrito por Kasana y colaboradores (2008). El método está basado en la coloración parda que adquiere el sustrato íntegro cuando se añade una solución compuesta por iodo sobre el medio de cultivo, y en la ausencia de coloración de los productos generados tras la degradación de dicho sustrato.

A tal fin, se inoculó el medio CMC (Tabla M.24) con 10 μL del inóculo de cada cepa preparado previamente conforme se describe en el Apartado M.6.5., y se incubaron las placas a la temperatura óptima de estas durante 15 días.

Para el revelado de las placas, cada una de ellas fue inundada con solución de lugol comercial (Sigma-Aldrich, EEUU) compuesta por I_2 y KI, con un volumen tal que la superficie del medio de cultivo quedó completamente cubierta. Las placas Petri se mantuvieron tapadas y a temperatura ambiente durante 5 min, momento en el cual se eliminó la solución de lugol por decantación. La visualización de halos de color amarillo en torno a las colonias degradadoras de CMC en contraste con un fondo de color pardo fue prácticamente inmediata, cuantificando la actividad según se indica en el Apartado M.6.6.1.8.

M.6.6.1.4. Evaluación de la actividad proteolítica

La capacidad bacteriana de producir proteasas habitualmente se determina en el medio de cultivo SMA modificado (Tabla M.25). En la formulación de dicho medio se incluye leche en polvo como fuente principal de proteínas, las cuales otorgan un aspecto turbio o blanquecino a dicho medio. La actividad de las proteasas conduce en última instancia a la clarificación del color del medio.

Así pues, se depositaron gotas de 15 μ L de los inóculos bacterianos obtenidos tal y como se detalla en el Apartado M.6.5. sobre la superficie del medio SMA. Las placas fueron incubadas según la temperatura óptima de cada cepa durante 2-7 días, momento en el cual se procedió a la toma de resultados. La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias fue considerada indicativa de la síntesis y actividad de las proteasas bacterianas, determinándose el correspondiente índice de actividad según se detalla en el Apartado M.6.6.1.8.

M.6.6.1.5. Evaluación indirecta de la producción de ACC deaminasa

Para la detección de la actividad del enzima ACC deaminasa, se empleó el método indirecto descrito por Penrose y Glick (2003). Concretamente, se evaluó la capacidad bacteriana de crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de N es el sustrato de dicho enzima, esto es, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, *1-aminocyclopropane-1-carboxylate*).

El medio de cultivo de elección para este ensayo fue el medio DF modificado (Tabla M.16) suplementado con D-Glucosa (2 g/L). Por un lado, la fuente habitual de N $[(NH_4)_2SO_4]$ fue reemplazada por un volumen de solución acuosa de ACC (esterilizada previamente por filtración) tal que la concentración final de la nueva fuente de N fue 3 mM. Por otro lado, el medio DF suplementado con D-Glucosa y conteniendo la fuente habitual de N fue empleado como medio de control del crecimiento.

Ambos medios fueron inoculados al 1% (v/v) con el inóculo correspondiente a cada cepa preparado tal y como se describe anteriormente (Apartado M.6.5.). La DO_{600} del medio recién inoculado fue medida en el espectrofómeto Novaspec II (Pharmacia Biotech, EEUU).

Los tubos de cultivo fueron incubados durante 7 días en las condiciones detalladas en el Apartado M.6.4.1. Transcurrido este periodo se evaluó el crecimiento de las cepas midiendo nuevamente la DO_{600} en el espectrofómetro anteriormente mencionado.

M.6.6.1.6. Evaluación de la actividad del enzima catalasa

La determinación de la actividad del enzima catalasa se realizó tal y como sugieren Subbarayan y Sarkar (2004). Se trata de un método basado en la observación del desprendimiento de burbujas de O_2 como consecuencia de la actividad de dicho enzima sobre el H_2O_2 .

Para ello, 10 μ L de cada inóculo bacteriano obtenido conforme se detalla en el Apartado M.6.5. fueron depositados sobre la superficie del medio rutinario de crecimiento de cada bacteria. Una vez las bacterias en estudio habían crecido, sobre cada una de las colonias bacterianas se depositó 10 μ L de una solución acuosa de H_2O_2 al 30% (v/v). La aparición inmediata de burbujas sobre la biomasa bacteriana fue considerada como un resultado positivo, indicativo de la formación de O_2 gaseoso.

M.6.6.1.7. Ensayos *in vitro* de antagonismo microbiano

M.6.6.1.7.1. Enfrentamiento bacteria-bacteria

El antagonismo entre las diferentes cepas que conforman un consorcio bacteriano puede suponer la pérdida de efectividad del mismo, y dicha interacción puede ser evaluada previamente *in vitro* mediante co-cultivo de las diferentes cepas a estudiar. En este caso el experimento fue realizado siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Gómez-Lama Cabanás y colaboradores (2018b).

Inicialmente se sembró en césped 100 μ L de una suspensión celular previamente ajustada a una $DO_{600} = 0.8$ de la cepa considerada como diana o *target* sobre la superficie de los medios habituales de crecimiento de las cepas estudiadas (LB y YEM). A continuación, sobre la superficie del medio inoculado se dispusieron gotas de 5 μ L ($DO_{600} = 1$) de cada una de las cepas a enfrentar, denominadas *challenger*. Así pues, las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 h, evaluando de forma periódica la aparición de halos de inhibición alrededor de las colonias de las cepas *challenger*.

M.6.6.1.7.2. Enfrentamiento bacteria-oomiceto/hongos fitopatógenos

Antes de realizar los ensayos de enfrentamiento *in vitro* se crecieron las cepas bacterianas en los medios PDA y MEA y los hongos fitopatógenos en LB y YEM (ver composición de los medios en el Apartado M.6.2.) a 25 °C, para confirmar que ambos tipos de microorganismos eran capaces de crecer con normalidad en estas condiciones.

Posteriormente, para cada organismo fitopatógeno se obtuvieron discos de su medio de cultivo habitual de crecimiento con micelio fúngico joven, con ayuda de un sacabocados estéril de 1 cm de diámetro. Estos fueron dispuestos, individualmente, en el centro de una placa Petri con el mismo medio (PDA o MEA, según el organismo). En la parte más externa de la misma placa se colocaron gotas de 5 μ L de cada inóculo bacteriano, incluyendo en cada placa una gota del mismo volumen de solución salina esteril como control negativo. Cabe destacar que en los ensayos de antagonismo frente a *B. mediterranea* ambos microorganismos fueron sembrados en las placas el mismo día. Por el contrario, en el caso de las especies *D. corticola*, *P. cinnamomi* y *A. mellea*, las bacterias fueron inoculadas, respectivamente, tras 1, 5 y 14 días de la colocación de los discos con micelio fúngico o del oomiceto. En el caso de *A. mellea* debe remarcarse que en el momento de depositar las gotas con el inóculo bacteriano se marcó en la base

de la placa Petri el alcance del micelio, así como el de los rizomorfos en caso de encontrarse formados.

Cada interacción patógeno-bacteria fue ensayada por triplicado y las placas fueron incubadas a 25 °C durante 10 días, evaluando periódicamente la aparición de halos de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor de las colonias bacterianas.

M.6.6.1.8. Cuantificación de actividades evaluadas en placa Petri

Para evaluar numéricamente la capacidad de las bacterias en estudio de producir sideróforos, solubilizar fosfato inorgánico, producir CMC-asas y proteasas, se calculó un índice de actividad en cada caso. Dicho índice correspondió con el cociente entre el diámetro de las colonias (mm) y el diámetro del halo formado alrededor de estas (mm) (Kumar y Narula, 1999).

M.6.6.2. Métodos analíticos

M.6.6.2.1. Evaluación de la producción de compuestos indólicos

Para cuantificar la cantidad de IAA (*indole-3-acetic acid*, ácido indol-3-acético) y compuestos indólicos relacionados producidos por las cepas en estudio, se empleó un método colorimétrico basado en la reacción de Salkowski. A pH ácido, las sales férricas oxidan el IAA y derivados en solución, dando lugar a la formación de un compuesto oxidado de color rosa-rojizo cuya absorbancia puede ser medida a determinada longitud de onda (Mayer, 1958).

Según los requerimientos nutricionales específicos de las cepas bacterianas en estudio, el experimento fue llevado a cabo empleando el medio de cultivo DF suplementado con D-Glucosa (2 g/L) o el medio YEM. Ambos fueron además suplementados con el precursor de auxinas (aminoácido L-triptófano) a una concentración final de 0.5 mg/mL. Por otro lado, con el objetivo de cuantificar la cantidad de compuestos indólicos producidos únicamente a partir de su precursor, se emplearon sendos medios sin el suplemento de L-triptófano.

Todos los medios fueron inoculados al 1% (v/v) con los inóculos bacterianos previamente obtenidos y a continuación se procedió a su incubación en las condiciones que se mencionan en el Apartado M.6.4.1, durante 24-48 h, en función de la bacteria en estudio.

Transcurrida la incubación, se recuperaron los cultivos y se midió la DO₆₀₀ de cada uno de ellos en el lector de placas infinite® 200 (TECAN, Austria). Adicionalmente, se recogió 1 mL de cada cultivo en tubos eppendorf y estos fueron centrifugados a 10,400 rpm durante 5 min. Se transfirió 50 µL del sobrenadante de cada tubo a placas de 96 pocillos, y se añadió a cada uno de ellos 150 µL de agente de Salkowski (1 mL FeCl₃·6H₂O 0.5 M; 49 mL HClO₄ 35%, v/v) descrito por Gordon y Weber (1951).

Para poder cuantificar los compuestos indólicos totales producidos por cada cepa, en el ensayo se incluyeron patrones de IAA de concentraciones conocidas. Se preparó una solución madre concentrada de IAA en etanol al 90% (v/v) y se realizaron diluciones de la misma en medio DF o YEM según el caso, en el rango de concentración 0-50 µg/µL. Los patrones fueron tratados de la misma forma que las muestras, añadiendo a los mismos el reactivo de Salkowski en proporción 2:1.

En todos los casos, las placas fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente durante 25 min, periodo tras el cual se pudo apreciar un cambio de color de la mezcla hacia rosa-rojizo. A continuación se midió la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm (DO_{530}) en el lector de placas TECAN infinite® 200 (Austria) y se cuantificó la cantidad de compuestos indólicos producidos por cada cepa a partir de los datos obtenidos para los patrones de IAA de concentraciones conocidas, sustrayendo previamente la intensidad de señal de fondo o ruido (absorbancia medida en ausencia del precursor de indoles).

M.6.7. Evaluación del metabolismo de ácido tánico

M.6.7.1. Ensayo de tolerancia

Para el estudio de la tolerancia a este tanino, se obtuvieron los inóculos bacterianos conforme se describe anteriormente (Apartado M.6.5), y se dispusieron gotas de 10 μ L de cada uno de ellos sobre el medio habitual de crecimiento de las bacterias en estudio, suplementado con diferentes concentraciones de ácido tánico (8 μ g/mL-5 mg/mL). Concretamente, a partir de una solución madre de ácido tánico en DMSO puro se prepararon placas con una concentración final de 8, 40, 200 μ g/mL y 1 mg/mL de ácido tánico.

Cabe destacar que previamente se descartó la toxicidad del DMSO sobre las cepas en estudio comprobando el crecimiento de las mismas en el medio rutinario de crecimiento suplementado únicamente con DMSO (0.2%, v/v). De forma paralela, se dispusieron gotas de 10 μ L de cada uno de los inóculos en dicho medio no suplementado, como control del crecimiento bacteriano.

Todas las placas fueron incubadas en las condiciones habituales (Apartado M.6.4.1.) durante 7-14 días. La tolerancia o sensibilidad de las cepas a cada concentración del tanino fue definida en base a la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo correspondiente.

M.6.7.2. Ensayo de utilización de ácido tánico como única fuente de carbono

La capacidad de utilizar ácido tánico como fuente de C fue evaluada en medio DF suplementado con ácido tánico a la menor y mayor concentración tolerada por cada cepa. Para ello, se inoculó 3 mL de medio DF al 1% (v/v) con los inóculos correspondientes. Como control del crecimiento, cada cepa fue además inoculada en medio DF al cual se había añadido D-Glucosa (2 g/L). La DO_{600} del medio recién inoculado fue medida en el espectrofómeto Novaspec II (Pharmacia Biotech, EEUU).

Tras 7 días de incubación en las condiciones de cultivo detalladas anteriormente (Apartado M.6.4.1), se evaluó el crecimiento de las cepas midiendo la DO_{600} de cada cultivo mediante en el espectrofómeto anteriormente mencionado.

M.7. Técnicas bioquímicas

M.7.1. Cuantificación de la actividad de enzimas hidrolíticos en la fracción libre y la asociada a células bacterianas

La actividad de enzimas bacterianos implicados en la descomposición de la materia orgánica y producidos extracelularmente fue estudiada a partir de cultivos líquidos. Para ello, se obtuvieron los inóculos bacterianos en la forma en que se detalla en el Apartado M.6.5., ajustándose en este caso el valor de la DO_{600} a 0.1 unidades de absorbancia. Por cada cepa estudiada, tres matraces conteniendo 20 mL de medio ME (Tabla M.27) fueron inoculados al 1% (v/v), siendo a continuación incubados a 25 °C y agitación constante (200 rpm) durante 7 días.

La actividad de los enzimas excretados al sobrenadante así como de aquellos adheridos a la membrana bacteriana fue evaluada conforme describen Mašinová y colaboradores (2018). Concretamente, transcurrido el periodo de incubación, se recuperó 10 mL de cada uno de los cultivos correspondientes a la misma cepa y estos fueron mezclados. Las muestras compuestas fueron entonces centrifugadas durante 3 min a 12,000 rpm. En todos los casos el sobrenadante (fracción extracelular) fue transferido a nuevos tubos, añadiendo 20 mL de tampón acetato sódico 50 mM pH 5 (acetato sódico 2.78 g, ácido acético glacial 900 μ L, agua destilada hasta 1 L).

Por otro lado, el *pellet* celular fue resuspendido en 20 mL del mismo tampón y centrifugado en las mismas condiciones dos veces para lavar las células. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 40 mL de tampón acetato sódico, obteniendo de esta forma la fracción celular.

La actividad de los enzimas asociados a las células y de aquellos liberados al cultivo líquido fue cuantificada mediante el método fluorimétrico descrito por Baldrian (2009). Dicho procedimiento se basa en el empleo del fluoróforo 4-metilumbeliferol (MUF), el cual emite fluorescencia en su forma libre pero no así cuando se encuentra fusionado a otra molécula. Por lo tanto, cuando los enzimas en estudio actúan sobre su sustrato acoplado al fluoróforo MUF, este último es liberado emitiendo fluorescencia a determinada longitud de onda de excitación y emisión.

Concretamente, empleando los sustratos indicados en la Tabla M.29, se midió la actividad en ambas fracciones de los enzimas celobiohidrolasa (exocelulasa de tipo II, EC 3.2.1.91), β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), β -galactosidasa (EC 3.2.1.23), α -glucosidasa (EC 3.2.1.20), β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31), β -xilosidasa (EC 3.2.1.37), β -manosidasa (EC 3.2.1.25), α -arabinosidasa (EC 3.2.1.55), triacilglicerol acilhidrolasa (lipasa, EC 3.1.1.3), quitinasa (EC 3.2.1.14), fosfomonoesterasa (fosfatasa ácida, EC 3.1.3.2).

A tal fin, en primer lugar se preparó una solución en DMSO de cada uno de los sustratos marcados con MUF (2.7 mM), así como del propio fluoróforo libre (1 mM), agitando las disoluciones por inversión de los tubos.

Tabla M.29. Relación de sustratos marcados con MUF y enzimas que permiten detectar mediante fluorimetría.

Sustrato marcado ^a	Enzima detectado	Actividad enzima/Sustratos naturales ^b
4-metilumbeliferil-N-celobiopiranosido	celobiohidrolasa	Hidrólisis de enlaces β -1,4-D-glicosídicos de los extremos no reductores de la celulosa
4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido	β -glucosidasa	Oligosacáridos generados tras la actividad de la celobiohidrolasa (e.g., celobiosa)
4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido	α -galactosidasa	Galactomanano, xiloglucano, arabinoxilano
4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido	β -galactosidasa	Galactomanano, xiloglucano, arabinoxilano, pectina
4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido	α -glucosidasa	Almidón
4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido	β -glucuronidasa	Pectina
4-metilumbeliferil- β -D-xilopiranosido	β -xilosidasa	Xilano y pectina
4-metilumbeliferil- β -D-manopiranosido	β -manosidasa	Galactomanano
4-metilumbeliferil- α -L-arabinopiranosido	α -arabinosidasa	Galactomanano, xiloglucano, arabinoxilano, pectina
4-metilumbeliferil-caprilato	lipasa	Lípidos
4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminido	quitinasa	Quitina
4-metilumbeliferil-fosfato	fosfatasa ácida	Ésteres de fosfato

^a Todos los sustratos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich (EEUU).

^b Rytioja *et al.*, 2014

A continuación, en placas de 96 pocillos se mezclaron 200 μ L de cada muestra en estudio con cada uno de los sustratos a una concentración final de 450 μ M. A su vez, con el objetivo de cuantificar la cantidad del fluoróforo libre generado, se incluyeron patrones de referencia de la solución de MUF en DMSO en concentraciones conocidas. Dichos patrones fueron procesados al igual que las muestras, añadiendo por tanto a cada pocillo 200 μ L de cada una de las fracciones en estudio, de tal forma que la concentración final de MUF libre se encontró comprendida en el rango 0-100 μ M.

Las placas fueron incubadas a 40 °C y la intensidad de fluorescencia fue medida a los 5 y 125 min a una longitud de onda de excitación y emisión de 355 y 460 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia debida a la formación del fluoróforo libre fue registrada mediante un lector de fluorescencia infinite® 200 (TECAN, Austria). La cuantificación de la actividad de cada enzima fue realizada en base a la recta patrón calculada.

M.8. Ensayos en planta

M.8.1. Esterilización y germinación de semillas y desinfección de bellotas

M.8.1.1. Semillas de los géneros *Lathyrus*, *Vicia*, y *Trifolium*

Las semillas de las especies *Lathyrus intricatus*, *L. cicera*, *Vicia sativa* subsp. *angustifolia*, *V. disperma*, *Trifolium glomeratum* y *T. cherleri* fueron esterilizadas en superficie mediante inmersión de las mismas en una solución acuosa de NaClO al 1% (v/v) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las semillas fueron lavadas cinco

veces con agua destilada estéril, y se dejaron en imbibición durante tres horas en agua destilada estéril.

A continuación, estas fueron transferidas a placas Petri que contenían papel de filtro previamente esterilizado en horno (160 °C, 2 h), y se humedecieron con 2 mL de agua destilada estéril. Las placas se mantuvieron en oscuridad a 20 °C durante 2-4 días, hasta que la mayoría de las semillas habían germinado.

M.8.1.2. Semillas de *Medicago sativa* L. 'Victoria'

La esterilización superficial de las semillas de *Medicago sativa* L. 'Victoria' (alfalfa) consistió en una inmersión inicial de las mismas en solución acuosa de HgCl₂ (2.5%, p/v) durante 9 min, mientras se realizaban agitaciones periódicas. A continuación, la solución de HgCl₂ fue eliminada y las semillas fueron lavadas 5-6 veces con agua destilada estéril. Tras mantener las semillas en imbibición en agua destilada estéril durante 2 h, nuevamente se realizaron 2-3 lavados y estas fueron transferidas a placas Petri cubiertas con papel de filtro previamente esterilizado en horno y humedecido con agua destilada estéril. Finalmente, se germinaron en oscuridad a 28 °C hasta que pudo observarse la formación de la radícula en gran parte de las semillas esterilizadas (aproximadamente 24 h).

M.8.1.3. Bellotas de *Quercus ilex* subsp. *ballota* y *Q. pyrenaica* Willd.

Inicialmente, las bellotas de ambas especies leñosas fueron lavadas abundantemente con agua del grifo, al objeto de eliminar partículas de suelo y material vegetal adherido a su superficie. A continuación se sumergieron en una solución acuosa de NaClO al 1% (v/v) durante 3 min, periodo tras el cual la solución fue eliminada. Las bellotas desinfectadas se lavaron inmediatamente con agua del grifo, y se dejaron en imbibición durante aproximadamente 24 h. Transcurrido este periodo, se descartaron todas aquellas que se encontraban flotando en la superficie del agua de imbibición.

M.8.2. Cultivo de plantas

M.8.2.1. Soluciones empleadas

Para el crecimiento de las plantas se empleó la solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975) cuya composición se detalla en la Tabla M.30.

Tabla M.30. Composición de la solución nutritiva para plantas de Rigaud y Puppo.

Solución nutritiva para plantas Rigaud y Puppo (Rigaud y Puppo, 1975)	
Componentes	Cantidad
KH ₂ PO ₄	0.2 g
MgSO ₄ ·2H ₂ O	0.2 g
KCl	0.2 g
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.12 g
Na ₂ FeEDTA	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.004 g
NO ₃ NH ₄ ^a	0.4 g / 0.16 g
Solución de elementos traza	100 µL
Agua destilada	Hasta 1 L
Solución de elementos traza	
H ₃ BO ₃	18.6 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	29 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	24 g
Agua destilada	Hasta 1 L

^a Únicamente fue añadido como fuente de N en el caso de los controles negativos (plantas sin inocular) en los experimentos de cultivo de plantas en tubo (0.4 g/L) y en todos los tratamientos de los ensayos realizados en jarras Leonard (0.16 g/L). El pH fue ajustado a 7

M.8.2.2. Macetas con plantas-trampa

Para la obtención de plantas-trampa, en primer lugar se esterilizaron macetas de 12 cm de diámetro, así como arena previamente lavada con agua del grifo. La arena fue esterilizada mediante tindalización para evitar la proliferación de esporas bacterianas (121 °C, 20 minutos, durante tres días consecutivos). Seguidamente, esta fue mezclada en proporción 3:1 con el suelo procedente de la parcela LSP de Lanjarón (Tabla M.1).

Cuatro semillas germinadas de las especies *L. sphaericus*, *L. cicera*, *V. amphicarpa*, *V. disperma*, *T. glomeratum* y *T. cherleri* fueron sembradas de forma equidistante en las macetas preparadas, disponiendo seis macetas por cada una de las especies en estudio. Con el objetivo de evitar la contaminación fúngica y la pérdida de humedad de las macetas, la superficie de cada una de ellas fue cubierta con una fina capa de perlita previamente esterilizada. Así pues, las plantas se mantuvieron durante 21 días en cámara de cultivo con ciclos día/noche de 16/8 h y 24/20 °C, intensidad luminosa de 125-162 µmol·m⁻²·s⁻¹ y manteniendo la humedad relativa en torno a un 70%. Las plantas fueron regadas periódicamente con agua del grifo y extraídas de las macetas cuando un 10% de las mismas habían entrado en floración (21 días aproximadamente).

M.8.2.3. Cultivo gnotobiótico en tubos: ensayos de nodulación cruzada

El cultivo de plantas leguminosas en tubos se realizó según el método descrito por Olivares y colaboradores (1980). Para ello, en primer lugar se esterizaron en autoclave (121 °C, 20 min) tubos de vidrio de 20 mm de diámetro y 200 mm de largo que contenían tiras de papel de filtro a modo de soporte de las semillas, y 10 mL de solución nutritiva Rigaud y Puppo libre de N (salvo en el caso de los controles negativos; Tabla M.30).

Una vez que las semillas de las plantas leguminosas habían germinado, estas fueron dispuestas individualmente y en condiciones de esterilidad sobre las tiras de papel filtro, y a continuación los tubos fueron externamente cubiertos con papel opaco en su mitad inferior para evitar la incidencia directa de la luz sobre las raíces. Los tubos fueron llevados a cámara de cultivo de plantas, donde se mantuvieron con una intensidad lumínica de 125-162 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad, a 24/20 °C y humedad relativa cercana al 70%.

Transcurridos siete días, las plántulas fueron inoculadas con 100 μL de una suspensión bacteriana de la cepa en estudio así como de las cepas empleadas como control positivo de la inoculación, ajustando la DO_{600} del inóculo a 0.5 unidades de absorbancia. Las plántulas empleadas como control negativo fueron tratadas con el mismo volumen de una solución acuosa de NaCl (0.9%, p/v) previamente esterilizada. En todos los casos, se incluyeron 15 plántulas por cada una de las combinaciones hospedador-cepa inoculada, así como para el tratamiento negativo o control.

Tras 21 días de crecimiento en cámara de cultivo de plantas en las condiciones mencionadas, se procedió a valorar visualmente la formación de nódulos así como al aspecto general de los mismos.

M.8.2.4. Cultivo gnotobiótico en jarras Leonard: estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre *M. sativa*

Para el estudio del efecto que la inoculación de determinadas cepas bacterianas puede ejercer sobre plantas herbáceas, se empleó el sistema de dos recipientes desarrollado por Leornad (1943) para el cultivo de plantas. Dicho sistema consiste en la colocación de una maceta u otro soporte adecuado para el desarrollo de las plantas, sobre un recipiente el cual contiene la solución nutritiva para las mismas. Ambos han de encontrarse conectados mediante cualquier tipo de elemento que permita el ascenso de la solución nutritiva hacia las macetas. De esta forma es posible estudiar el efecto de las cepas inoculadas evitando contaminaciones con otros microorganismos.

Para ello, en primer lugar se rellenaron las macetas empleando como sustrato vermiculita del número 3 previamente lavada con agua del grifo, y se cubrió la superficie de las mismas con papel de aluminio. Por otro lado, el recipiente inferior de vidrio de 1L de volumen se rellenó con solución mineral de Rigaud y Puppo. Para conectar ambos recipientes, se acopló una tira de papel de filtro de 2.5 x 15 cm a la base de cada maceta, y una vez encajada la maceta en el recipiente inferior se procedió a la esterilización de las jarras Leonard en autoclave (121 °C, 20 min).

En condiciones de esterilidad, en cada una de las macetas se sembraron cuatro semillas de alfalfa esterilizadas y germinadas previamente (Apartado M.8.1.2.), de forma equidistante. Cada una de las semillas fue inoculada con 100 μL de una suspensión de la cepa bacteriana en estudio ($\text{DO}_{600} = 1$). En el caso de los controles negativos, las semillas fueron inoculadas con el mismo volumen de solución acuosa de NaCl 0.9% (p/v) estéril. Cabe destacar que para cada una de las cepas a estudiar así como para el tratamiento control se incluyeron cuatro macetas conteniendo cada una de ellas cuatro semillas (16 réplicas).

Tras la inoculación, las semillas fueron ligeramente cubiertas con una capa de perlita previamente esterilizada en autoclave, para evitar tanto contaminaciones como la pérdida de humedad del sustrato. Finalmente, con el objeto de evitar la incidencia de la luz sobre la solución nutritiva y las raíces, el recipiente inferior de vidrio fue externamente cubierto con papel opaco. Así pues, las jarras Leonard fueron llevadas a cámara de cultivo de plantas (intensidad luminosa: $219\text{-}370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad; $24/20^\circ\text{C}$ y humedad relativa 40-60%) y mantenidas en dichas condiciones durante 30 días. Durante este periodo, los recipientes inferiores de vidrio fueron rellenados en condiciones de esterilidad con solución de Rigaud y Puppo diluida 1:1 con agua destilada estéril.

Una vez finalizado el periodo de incubación mencionado, se determinó el peso fresco y peso seco de la parte aérea de cada planta, así como la altura del tallo de las mismas (ver Apartado M.8.2.8.).

M.8.2.5. Cultivo en macetas: estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre quercíneas

Con la finalidad de determinar la naturaleza del efecto de la inoculación de las cepas en estudio (así como de consorcios bacterianos) sobre quercíneas, se llevaron a cabo experimentos en cámara de cultivo de plantas.

Para ello, se rellenaron macetas hasta prácticamente su totalidad con vermiculita previamente lavada con agua del grifo. Todas las macetas fueron cubiertas adecuadamente con papel de aluminio y esterilizadas en autoclave a 121°C durante 20 min. Las bellotas de *Q. pyrenaica* y *Q. ilex* subsp. *ballota* desinfectadas conforme se describe en el Apartado M.8.1.3. fueron sembradas en orificios superficiales previamente realizados en la vermiculita; concretamente, en cada maceta se sembraron dos bellotas de la misma especie, situándolas de forma paralela y orientando el extremo distal de cada una de ellas en sentido opuesto. Por cada una de las cepas inoculadas así como en el caso del control sin inocular se dispusieron seis macetas, alcanzando por lo tanto 12 réplicas.

A continuación se procedió a la inoculación de cada una de las bellotas con 100 μL de una suspensión bacteriana ajustada previamente a $\text{DO}_{600} = 1$, y el mismo volumen de solución salina estéril (NaCl 0.9%, p/v) en el caso de los controles negativos. Todas las bellotas fueron cubiertas con una fina capa de vermiculita estéril y finalmente con una capa de perlita esterilizada con anterioridad en autoclave. Las macetas fueron trasladadas a cámara de cultivo de plantas donde se mantuvieron en las siguientes condiciones: ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h, $24/20^\circ\text{C}$, humedad relativa de entorno

al 70% e intensidad luminosa de $184\text{-}202\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las plantas fueron regadas periódicamente con agua del grifo durante 4 meses.

Al término del ensayo, se determinó el peso fresco y peso seco de la parte aérea de cada planta (Apartado M.8.2.8.).

M.8.2.6. Cultivo en vivero: inoculación de plantones de *Q. pyrenaica*

En noviembre de 2012 el grupo de investigación recogió manualmente aproximadamente 2000 bellotas de *Q. pyrenaica* en diferentes melojares ubicados en la ladera del término municipal de Cáñar. Estas bellotas fueron sembradas en el plazo de 48 horas en un vivero de la empresa Paisajes del Sur (Colomera, Granada), el cual llevó a cabo el cultivo de los plantones de *Q. pyrenaica*. Siguiendo el procedimiento y condiciones de cultivo típicas de viveros que producen material vegetal de aplicación comercial, los plantones de roble melojo fueron obtenidos empleando turba como sustrato. Estos fueron inoculados aproximadamente seis meses después de la germinación de las bellotas con un consorcio bacteriano compuesto por las cepas *Bradyrhizobium canariense* GV101 y *Arthrobacter globiformis* AFG20.1, el cual fue previamente obtenido por el grupo de investigación. Concretamente, los plantones fueron inoculados en la base del tallo con 100 μL de una suspensión bacteriana de cada cepa bacteriana ($\text{DO}_{600} = 1$) preparada conforme se detalla en el Apartado M.6.5. Una vez inoculados, los plantones fueron mantenidos en vivero durante seis meses más.

M.8.2.7. Tareas de repoblación forestal con plantones de *Q. pyrenaica*

En las parcelas localizadas en las áreas NPF, AZC y AZL (Tabla M.1), se llevaron a cabo tareas de repoblación forestal dentro del programa implementado por las autoridades del Parque Nacional de Sierra Nevada, siendo responsable el Dr. Javier Cano-Manuel. Para ello, los plantones obtenidos en el vivero forestal (Apartado M.8.2.6.) fueron trasplantados seis meses después de la inoculación en las zonas indicadas, colocando cinco plantas tratadas y otras cinco no tratadas (de forma alterna) en diez filas consecutivas.

M.8.2.8. Procesamiento del material vegetal: determinaciones biométricas

Inicialmente se midió la longitud del tallo de cada planta con ayuda de una regla. Para determinar el peso seco de la parte aérea de las plantas, este fue separado de las raíces con ayuda de una tijera y medido individualmente en una balanza de precisión. El peso seco se determinó tras proceder al secado de cada parte aérea en estufa a $60\ ^\circ\text{C}$ durante 48 h para asegurar la completa desecación de las muestras.

M.9. Análisis estadístico univariante y de variables bidimensionales

Todos los análisis estadísticos de una variable se realizaron mediante el uso del software libre R y teniendo en cuenta en todos los casos niveles de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) para los contrastes de hipótesis.

M.9.1. Test de normalidad y homocedasticidad

Para comprobar si una variable en estudio sigue una distribución normal o gaussiana se empleó el test de Shapiro-Wilk bajo la función *shapiro.test* incluida en R base. En aquellos casos en los que se verificó que el conjunto de datos procedía de una población con distribución normal, se estudió la homocedasticidad de la variable en estudio. Esto es, si la varianza de dicha variable correspondiente a los grupos a comparar era homogénea. Dicho contraste fue realizado mediante el test de homogeneidad de varianzas de Levene, empleando la función *leveneTest()* del paquete *car* (Fox y Weisberg, 2011).

M.9.2. Contrastes paramétricos en poblaciones normales

Para aquellas variables de distribución normal se emplearon estadísticos paramétricos para comparar los diferentes conjuntos de datos según las características específicas de los mismos

M.9.2.1. Comparación de medias de muestras homocedáticas

Cuando la varianza de la variable en estudio era homogénea en las distintas muestras en estudio, se emplearon diferentes estadísticos de contraste paramétrico de medias en función del número de grupos a comparar.

M.9.2.1.1. Comparación de dos grupos

El test de dos muestras basado en el estadístico *t* de Student fue ejecutado bajo la función *t.test()* incluida en R base en aquellos casos en los que se comparó la media de dos grupos independientes.

M.9.2.1.2. Comparación de tres o más grupos

En aquellos casos en los que se considera una variable de distribución normal, sobre la que actúa un único factor que puede presentarse bajo un número de niveles *t* independientes ($t > 2$) y se cumplen las condiciones de homocedasticidad, se debe aplicar el test ANOVA (*Analysis Of VAriance*, Análisis de la varianza) de una vía. Considerando que a este tipo de análisis también se le conoce como ANOVA con un factor al modelo lineal, en primer lugar se especificó y ajustó el modelo lineal del ANOVA mediante la función *lm()* incluida en R base. El test ANOVA fue posteriormente aplicado a dicho modelo mediante la función base *anova()*.

M.9.2.1.3. Contrastes *post-hoc* o no planeados

Si el nivel resultante de significación del test ANOVA era inferior al nivel de significación considerado ($\alpha = 0.05$), se procedió a la identificación de aquellos grupos entre los que se detectaron diferencias en cuanto a sus medias. Para ello se aplicó el contraste no planeado HSD de Tukey (*Honestly Significant Difference*, diferencia honestamente significativa de Tukey). Dicho test de comparaciones múltiples permite mantener bajo el error de Tipo I y se encuentra especialmente indicado en el caso de comparar grupos equilibrados. El test fue ejecutado mediante la función *HSD.test()* incluida en el paquete *agricolae* (de Mendiburu, 2017).

En aquellos casos en los que se compararon múltiples grupos con un único grupo considerado como control, el contraste *post-hoc* se realizó mediante el test de Dunnett. Para ello se hizo uso de la función *glht()* del paquete multcomp desarrollado por Hothorn y colaboradores (2008).

M.9.3. Contrastes no paramétricos en poblaciones con distribución desconocida

En aquellos casos en los que las variables no siguen una distribución normal, se empleó para el contraste de hipótesis test no paramétricos o de distribución libre para muestras independientes ya que estos no requieren conocer el tipo de distribución de la variable a analizar.

M.9.3.1. Comparación de dos grupos

El test de suma de rangos Mann-Whitney U (también conocido como test de Wilcoxon) fue aplicado para la comparación de una variable entre dos grupos. Para ello se empleó la función *wilcox.test()* de R base.

M.9.3.2. Comparación de múltiples grupos

Las variables que no pudieron ser analizadas mediante el test ANOVA por no cumplir los supuestos anteriormente expuestos (Apartado M.9.1.) fueron estudiadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis o prueba H. Se trata de una alternativa no paramétrica ANOVA indicada por tanto para contrastar la hipótesis de *t* muestras que han sido obtenidas de la misma población. Al igual que ocurre con el resto de técnicas no paramétricas, este se basa en el uso de la suma de rangos asignados a las observaciones.

El test de Kruskal-Wallis fue llevado a cabo mediante la función *kruskal.test()* incluida en R base. Cuando el nivel de significación obtenido en esta prueba resultó inferior al nivel de significación establecido, se llevó a cabo el test de Dunn de comparaciones múltiples implementando la función *dunn.test()* propia del paquete *dunn.test* (Dinno, 2017). Puesto que de forma genérica se considera que las técnicas no paramétricas son menos sensibles que sus análogas paramétricas y no permiten un buen control de la tasa de falsos positivos, el p-valor de los diferentes contrastes fue corregido mediante el método de ajuste de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples.

M.9.4. Correlación de variables bidimensionales

Cuando varias variables fueron medidas para una misma muestra y se pretendió determinar si existe una correlación estadísticamente significativa entre las mismas, se calcularon los coeficientes de correlación de Kendall y/o de Spearman. Ambos coeficientes pueden ser aplicados en los casos en los que no se asume la normalidad de los datos.

Los test de correlación fueron llevados a cabo mediante la función base *cor.test()* indicando el tipo de coeficiente específico a calcular.

Todas las funciones específicas de R empleadas tanto para los análisis estadísticos como para la generación del material gráfico de este trabajo se encuentran recogidas en la Tabla A.1 (Anexos).



RESULTADOS

La imagen muestra un individuo adulto de *Quercus pyrenaica* en la zona de muestreo XZF.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.



CAPÍTULO I

**Análisis de los rizobios endosimbiontes de especies de las leguminosas *Vicia*,
Lathyrus y *Trifolium* empleadas para el mantenimiento de las áreas pasto-
cortafuegos del Parque Nacional de Sierra Nevada**

La imagen muestra una planta de la especie leguminosa *Lathyrus cicera*.

Fuente: Ana V. Lasa.

I.1. Introducción

I.1.1. Leguminosas de pastos naturales

Las leguminosas más apropiadas con las que sembrar áreas pasto-cortafuegos que puedan ser mantenidas por el ganado, son aquellas que establecen simbiosis con los rizobios naturalmente presentes en estas zonas. Dos de los parámetros que más influencia ejercen sobre la producción ganadera son el valor nutritivo y la ingesta voluntaria del forraje por parte del ganado (Lüscher *et al.*, 2014). En este sentido, los rizobios actúan directamente sobre ambos aspectos mediante la fijación de N₂ atmosférico, debido al consecuente elevado contenido proteico de las leguminosas y al buen estado de salud de las mismas que hace que estas resulten atractivas para el ganado.

De las múltiples leguminosas conocidas, algunos de los géneros más destacados por su interés forrajero son *Lathyrus*, *Vicia* y *Trifolium*. Concretamente, el género *Lathyrus* despierta especial interés desde el punto de vista pascícola dada su resiliencia agronómica (Llorent-Martínez *et al.*, 2017). En general, las especies de este género son frecuentes en bosques abiertos o en los márgenes forestales, aunque algunas son cultivadas para la obtención de forraje ganadero. Dos especies que forman parte de los pastos naturales son *L. cicera* y *L. intricatus* (conocida en la actualidad como *L. sphaericus*), si bien la primera ha sido también cultivada desde la antigüedad en la Península Ibérica y el sureste de Francia (Vaz Patto y Rubiales, 2014). Ambas se caracterizan por su elevada digestibilidad y el consecuente gran valor nutritivo. Las plantas de las dos especies, poseen a su vez un alto contenido en flavonoides y proteína bruta, si bien en este último caso la especie *L. sphaericus* muestra valores más altos (Robles *et al.*, resultados sin publicar).

Por otro lado, el género *Vicia* incluye diversas especies que constituyen parte del forraje ganadero en el continente europeo. En la región mediterránea la especie *V. disperma* es muy común, concretamente en la Península Ibérica, Italia, sur de Francia y en el norte de África. Se trata de una especie resistente a la sequía, altamente productora de frutos, y de buenas propiedades agronómicas (Megías *et al.*, 2016). Además, sus semillas ricas en polifenoles y su alto contenido en proteínas y ácidos grasos ponen en valor sus características nutricionales. Su congénere *V. sativa* subsp. *angustifolia*, conocida actualmente como *V. amphicarpa*, también se caracteriza por su contenido en proteína bruta y especialmente en antioxidantes totales. A su vez, es una especie de gran interés por su alta digestibilidad (Robles *et al.*, resultados sin publicar).

La cuenca mediterránea, el oeste del Norte América y la zona montañosa del este africano son tres regiones que cubren una amplia diversidad de especies del género *Trifolium* (Ellison *et al.*, 2006). Dicho género se caracteriza por su porte rastrero, y algunas especies han sido empleadas como plantas forrajeras durante siglos. Otras, por el contrario, poseen un menor interés pascícola por su moderado valor nutritivo, como es el caso de *T. glomeratum* y *T. cherleri*. A modo de ejemplo, esta última especie se caracteriza por una reducida digestibilidad y un bajo contenido en antioxidantes totales y enzimáticos, siendo por tanto su valor nutritivo considerado como mediocre (Robles *et al.*, resultados sin publicar). Sin embargo, el interés de dichas especies radica en la frecuencia en la que se pueden encontrar en los pastizales de las dehesas.

I.1.2. Sistemática de rizobios

Como ya se ha mencionado, los rizobios pueden desempeñar un papel crucial en la mejora de las propiedades nutritivas de ciertas leguminosas que forman parte del forraje del ganado. Por tanto, el análisis de las relaciones filogenéticas entre rizobios así como su descripción taxonómica constituye uno de los pasos iniciales hacia la mejora del rendimiento de las leguminosas de pastos naturales.

I.1.2.1. Identificación bacteriana

La taxonomía bacteriana evoluciona continuamente de tal forma que los criterios para definir especies han ido variando desde el inicio de la bacteriología. Inicialmente, los *síntomas* inducidos en la planta hospedadora eran esenciales para la diferenciación de especies en el caso de los rizobios, considerándose como *síntomas* la formación de nódulos en las raíces de plantas leguminosas. Así surgió el concepto de los *grupos de inoculación cruzada*, definidos en un inicio como “grupos de plantas entre las cuales las bacterias aisladas de sus nódulos radiculares son mutuamente *intercambiables* [capaces de nodular las plantas del mismo grupo de inoculación cruzada]” (Fred *et al.*, 1932). La descripción de las primeras especies rizobianas estuvo basada en este criterio. Sin embargo, Jordan en 1982 realizó el primer cambio en los criterios fijados para definir especies, aplicando una propiedad fisiológica como la tasa de crecimiento para reclasificar una especie en un nuevo género. Desde entonces, la taxonomía numérica o basada en principios fenéticos creció en importancia aumentando el número de características fenotípicas a tener en cuenta para la definición de especies bacterianas. Sin embargo, en el caso de los rizobios las propiedades fenotípicas no han resultado demasiado resolutivas para tal fin, por lo que la llegada de las técnicas de secuenciación de DNA supuso uno de los cambios más grandes en la sistemática de este grupo de bacterias.

El gen codificante del RNA de la subunidad pequeña ribosomal 30S (16S rRNA, gen *rrs*) fue el gen de elección para los estudios de evolución y taxonomía de rizobios en un inicio, dado su nivel de conservación y función esencial del rRNA codificado, entre otras características (Rajendhran y Gunasekaran, 2011). Sin embargo, con los avances realizados en el ámbito de la sistemática bacteriana las limitaciones de este gen han ido quedando demostradas. En determinadas ocasiones este no resulta resolutivo puesto que diferentes especies de rizobios con rasgos fisiológicos completamente distintos muestran secuencias prácticamente idénticas (Young *et al.*, 2001). Por otro lado, en individuos del género *Rhizobium* se ha descrito el fenómeno de mosaicismo, originado por la transferencia horizontal de un individuo a otro y posterior recombinación de este gen. En dichos casos, la identificación de especies en base a la secuencia parcial del gen *rrs* puede llevar a la obtención de resultados erróneos si la secuencia en estudio muestra homología a una sola parte de la estructura de tipo mosaico.

A su vez cabe destacar que el número de copias por genoma del gen *rrs* puede ser muy variado en función del organismo considerado, existiendo hasta tres copias en el genoma de diferentes cepas y especies del género *Rhizobium*, según la base de datos *rrnDB* (Stoddard *et al.*, 2015). Si bien para la mayoría de las bacterias las diferentes copias del gen *rrs* resultan idénticas o muy similares, en determinados organismos se han detectado copias divergentes en cuanto a su secuencia (Rajendhran y

Gunasekaran, 2011). Así, los problemas de mosaicismo y heterogeneidad intragenómica concernientes al gen *rrs* hacen que la sistemática de los rizobios no deba basarse exclusivamente en dicho gen. En la actualidad, los estudios taxonómicos convergen todos hacia el análisis de varios genes cromosómicos con los que reforzar los resultados obtenidos con el gen ribosomal. Concretamente, los genes *housekeeping* *recA* (codifica la proteína A implicada en la recombinación y reparación del DNA), *atpD* (subunidad β de la ATP sintasa), *glnII* (glutamina sintetasa II), *gyrB* (subunidad β de la girasa), *rpoB* (subunidad β de la RNA polimerasa) *truA* (tRNA pseudouridina sintasa), *thrA* (aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa implicada en la síntesis de treonina) han sido considerados dianas adecuadas a tal fin, si bien su idoneidad depende del género de rizobio en estudio. La mayor variabilidad nucleotídica de estos genes con respecto al gen ribosomal, el suficiente nivel de conservación entre bacterias como para poder inferir relaciones filogenéticas, su existencia en copia única en los genomas bacterianos y las funciones esenciales de las proteínas que codifican los hacen ideales para este tipo de estudios (Gaunt *et al.*, 2001; Cobo-Díaz *et al.*, 2014; Pérez-Yépez *et al.*, 2014). Así pues, el análisis de genes cromosómicos denominados *core* (*rrs* y genes *housekeeping*) constituye la base de la sistemática rizobiana vigente (Peix *et al.*, 2015). Gracias a la inclusión del análisis de genes *housekeeping* en la descripción de especies de rizobios, se sabe que hasta el momento de escritura de esta Tesis la familia *Rhizobiaceae* cuenta con los géneros *Rhizobium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Shinella*, *Allorhizobium*, *Agrobacterium*, y los más recientemente descritos *Ciceribacter*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium*, *Pseudorhizobium* y *Gellertiella*. El ascendente número de plantas hospedadoras analizadas, los nuevos hábitats estudiados, así como los avances técnicos que conciernen a la sistemática bacteriana hacen que el número de especies descritas de esta familia crezca rápidamente con el tiempo. Tal es así que en la actualidad, el número de especies del género *Rhizobium* válidamente descritas es de 112 según la LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (Euzéby, 1997), siendo de 86 en el año 2016.

I.1.2.2. Simbiovariedades (simbiovares o variantes simbióticas)

Los conceptos sinónimos *simbiovariedad*, *variante simbiótica* o *simbiovar* (sv.) aluden a un conjunto de cepas bacterianas distinguible de otro grupo por la capacidad de nodular diferentes hospedadores (Rogel *et al.*, 2011). Esta diferente especificidad de los rizobios por los hospedadores se encuentra determinada por los genes de nodulación del operón *nodABC*, implicados en la síntesis de los factores de nodulación Nod necesarios para el reconocimiento planta-rizobio y la formación de los nódulos radiculares (Perret *et al.*, 2000). Al conjunto de genes de nodulación y genes implicados en la fijación de N_2 (genes *nif*) se le denomina *genes simbióticos* (Velázquez *et al.*, 2010).

En el caso de los rizobios de rápido crecimiento y en algunos de crecimiento intermedio, los genes simbióticos se hallan en plásmidos (pSym), mientras que la mayoría de los rizobios de crecimiento intermedio y los de lento crecimiento albergan dichos genes en islas simbióticas cromosómicas (Velázquez *et al.*, 2010). En todos los casos, la transferencia horizontal de los genes simbióticos es un fenómeno habitual en la rizosfera, pudiéndose transferir dicha información genética de plásmidos a islas simbióticas (Nakatsukasa *et al.*, 2008), de bacterias a plantas (Broothaerts *et al.*, 2005)

y entre bacterias (Rogel *et al.*, 2001). Es por este mismo motivo por el que los genes simbióticos no son buenos marcadores taxonómicos, si bien debe remarcarse que en la descripción de especies de rizobios también se incluye el análisis de ciertos genes implicados en la simbiosis rizobio-leguminosa, recibiendo el nombre de *genes auxiliares* o *accesorios*. Entre los genes auxiliares más ampliamente estudiados se encuentra el marcador simbiótico *nifH* y los genes de nodulación *nodD*, *nodA* y *nodC*. Estos últimos se han mostrado especialmente útiles para la definición de simbiovariedades (Laguerre *et al.*, 2001; Steenkamp *et al.*, 2008; Rogel *et al.*, 2011), desplazando el uso del gen *nifH* dada su presencia en genomas tanto de bacterias noduladoras como de fijadores en vida libre. A su vez, entre los genes de nodulación el *nodC* ha sido el más ampliamente estudiado en el grupo de bacterias de los rizobios. Este gen codifica una N-acetilglucosaminiltransferasa implicada en los primeros pasos de la síntesis de los factores Nod, siendo por lo tanto un determinante del rango de hospedadores de los rizobios. Así pues, para las cepas correspondientes a una de las especies más estudiadas de este grupo de bacterias como es *R. leguminosarum* se conocen tres simbiovares distintos en base a la secuencia de dicho gen: *viciae*, *phaseoli* y *trifolii*.

La transferencia génica de los genes simbióticos puede tener lugar incluso entre bacterias cuyo *background* o fondo genómico es considerablemente diferente, por ejemplo, entre especies de diferentes géneros (Martínez-Romero, 2009). Todo ello conduce a que cepas de un mismo simbiovar puedan pertenecer a diferentes especies de rizobios, así como a la existencia de grupos de cepas adscritas a diferentes simbiovariedades pero pertenecientes a la misma especie bacteriana (Rogel *et al.*, 2011). Por ejemplo, varios autores han descrito que cepas aisladas de *Phaseolus vulgaris* pertenecientes a las especies *R. gallicum*, *R. giardini*, *R. leguminosarum*, *R. etli* y *R. phaseoli* tienen en común la correspondencia al simbiovar *phaseoli* (Jordan, 1984; Segovia *et al.*, 1993; Amarger *et al.*, 1997; Ramírez-Bahena, 2008). Por el contrario, cepas de la especie *R. leguminosarum* adscritas a los simbiovares *phaseoli*, *trifolii* y *viciae* nodulan por ejemplo plantas de los géneros *Phaseolus*, *Trifolium* y *Vicia*, respectivamente (Jordan, 1984), quedando patente la diferencia en cuanto a los genes de nodulación pese a la similitud de su *background* genómico.

El gen *nodC* no es estudiado exclusivamente para la descripción de especies y la definición de simbiovares. En la mayoría de los genomas rizobianos secuenciados hasta la fecha, este se encuentra en copia única. Debido además a su considerable grado de conservación es posible analizar filogenéticamente todas las secuencias disponibles de dicho gen en las bases de datos, lo cual resulta de gran utilidad en los estudios de biogeografía (Peix *et al.*, 2015).

I.1.3. Promiscuidad de plantas hospedadoras en la interacción rizobio-leguminosa

El concepto de promiscuidad de las leguminosas se encuentra estrechamente relacionado con el término simbiovar y el rango de plantas hospedadoras de los rizobios. No todas las leguminosas se caracterizan por poseer el mismo nivel de promiscuidad. Algunas como las pertenecientes al género *Phaseolus* (tribu Phaseolae) pueden ser noduladas por cepas adscritas a simbiovares muy divergentes en cuanto a la secuencia del gen *nodC* (Flores-Félix, 2019), sin embargo otras se consideran hospedadores restrictivos, como las pertenecientes a las tribus Cicereae, Fabeae y Trifoliae (Peix *et*

al., 2015). De la misma manera, el rango de hospedadores que los rizobios son capaces de nodular puede ser muy variable. Algunos llegan a ser noduladores de tan solo un género vegetal y otros como *Rhizobium* sp. NGR234 son capaces de formar nódulos en las raíces de hasta más de 100 hospedadores, tanto plantas leguminosas como no leguminosas (Pueppke y Broughton, 1999).

Así pues, debe puntualizarse que los conceptos simbiovar y grupo de inoculación cruzada no siempre son análogos, tan solo en el caso de aquellos hospedadores restrictivos. Por ejemplo, las cepas pertenecientes a los simbiovares *viciae* y *trifolii* no muestran habilidad de nodulación cruzada, es decir, no son capaces de formar nódulos en las raíces de los géneros restrictivos *Trifolium* y *Viciae*, respectivamente. Sin embargo, los rizobios adscritos a ambos simbiovares son capaces de nodular el hospedador habitual del simbiovar *phaseoli* (*Phaseolus*), dado que este se clasifica como un género de leguminosa promiscua.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el grado de promiscuidad de una planta no debe establecerse en base a la diversidad taxonómica de los rizobios capaces de nodularla, sino en base a las diferentes secuencias de los genes implicados en la nodulación.

I.2. Diseño experimental

El aislamiento de rizobios capaces de nodular las especies *Lathyrus cicera*, *L. sphaericus*, *Vicia amphicarpa*, *V. disperma*, *Trifolium cherleri* o *T. glomeratum* fue realizado gracias a plantas-trampa. Para poder aislar endosimbiontes nativos, se empleó como sustrato suelo de una zona próxima a un área pasto-cortafuegos del Parque Nacional de Sierra Nevada, concretamente en la zona de Cortijo Quemado o parcela LSP (Apartado M.1.). Una vez aislados los rizobios del interior de los nódulos de las plantas hospedadoras, se estudió la diversidad genotípica de los mismos mediante el análisis de los perfiles RAPD, una técnica comúnmente aplicada en los estudios de diversidad de rizobios endosimbiontes de los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* (Santillana *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; Aoki *et al.*, 2010; Van Cauwenberghe *et al.*, 2014). Los patrones de bandas RAPD fueron agrupados en base al coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo el dendrograma correspondiente. Para la delimitación de los perfiles RAPD, se seleccionó un valor del coeficiente de correlación de Pearson del 70% como punto de corte, conforme al genotipado de cepas de rizobios realizado anteriormente por otros autores (Cobo-Díaz *et al.*, 2014). Concretamente, todos aquellos rizobios que mostraron perfiles RAPD con un nivel superior al 70% de dicho coeficiente fueron incluidos en el mismo perfil RAPD. De cada uno de los perfiles obtenidos, se seleccionó al menos una cepa aislada de plantas de cada una de las tribus vegetales (Fabeae y Trifolieae) como cepa representativa del perfil RAPD correspondiente.

El gen ribosomal *rrs*, los genes *housekeeping* (*recA*, *atpD* y *glnII*) y el gen de nodulación *nodC* de las cepas seleccionadas fueron secuenciados parcialmente y las secuencias obtenidas se procesaron bioinformáticamente. Con el objetivo de reducir el volumen de datos, facilitar la interpretación y eliminar la redundancia de los mismos, se delimitaron diferentes tipos, *clusters* o grupos filogenéticos y linajes independientes para cada gen analizado. Así pues, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de

Resultados

cada gen correspondientes a todas las cepas en estudio y un árbol filogenético, agrupándose bajo el mismo tipo todas aquellas cepas que mostraron valores de identidad de la secuencia superiores al 99%. Cabe destacar que, dada la elevada similitud frecuentemente detectada en el gen *rrs* incluso entre diferentes especies, se incluyeron en el mismo tipo de *rrs* tan solo las cepas que mostraban una secuencia idéntica de este gen. A su vez, para cada gen *housekeeping* y *nodC*, las cepas fueron distribuidas en el mismo *cluster* cuando se detectó un nivel igual o superior al 97% de identidad entre las secuencias de las mismas. De esta manera, las cepas se agruparon en diferentes *clusters*, en determinados casos formaron linajes independientes debido a la baja similitud (< 97%) con el resto de cepas y cepas tipo de especies descritas del género. Hay que indicar que para la construcción de los árboles filogenéticos basados en los genes *housekeeping* se incluyeron como referencia las cepas tipo de las especies válidamente descritas que se encontraban filogenéticamente más próximas a las cepas en estudio según la secuencia del gen ribosomal.

Además de para la determinación de las simbiovariedades, el gen *nodC* permite inferir las relaciones filogenéticas existentes entre rizobios aislados de los mismos hospedadores o de otras leguminosas que se hallan en diferentes puntos geográficos. Así pues, se llevó a cabo un estudio de biogeografía en el que la secuencia del gen *nodC* de las cepas en análisis fue comparada con la de cepas aisladas en diversas localizaciones y a partir de otras especies de leguminosas de la misma tribu que los hospedadores aquí considerados.

Finalmente se llevó a cabo un experimento de nodulación cruzada donde las seis especies vegetales fueron inoculadas individualmente con una cepa aislada de cada uno de los seis hospedadores. Asimismo, a modo de control de la nodulación (positivo y negativo, según el caso), las plantas fueron inoculadas con *R. leguminosarum* sv. *viciae* USDA 2370^T y *R. leguminosarum* sv. *trifolii* ATCC 14480, cepas conocidas por nodular las leguminosas del grupo de inoculación cruzada de los géneros *Vicia* y *Lathyrus*, y *Trifolium* respectivamente. Cabe mencionar que ante la dificultad de testar en los seis hospedadores una cepa representativa de cada uno de los tipos de *nodC* detectados, para los ensayos de nodulación cruzada se seleccionaron seis cepas, cada una de ellas aisladas de cada uno de los hospedadores, intentando cubrir la mayor diversidad posible de todos los genes *core*. De esta forma fue posible analizar el rango de hospedadores de las cepas bacterianas analizadas, contribuyendo además simultáneamente a la determinación del grado de promiscuidad de las plantas y cepas en estudio.

I.3. Resultados

I.3.1. Aislamiento de cepas y genotipado mediante RAPD

Un total de 205 cepas fueron aisladas del interior de nódulos maduros de color rosa-rojizos (aspecto indicativo de la presencia de leghemoglobina y posible fijación de N₂), formados en las raíces de las seis especies vegetales estudiadas. En concreto, se aislaron 43, 38, 36, 40, 42 y 6 cepas de los individuos de *V. sativa* subsp. *angustifolia*, *V. disperma*, *L. intricatus*, *L. cicera*, *T. cherleri* y *T. glomeratum*, respectivamente.

Cada una de las 205 cepas fue genotipada mediante la técnica RAPD *fingerprinting*, obteniéndose 54 patrones de bandas que mostraban un valor del coeficiente de correlación de Pearson inferior al 70% (Figura I.1). Por lo tanto, las cepas aisladas mostraron una gran diversidad genotípica, y si bien algunos perfiles como el XI, XIV, XIX, XLII y XLVIII se encontraban representados por varias cepas aisladas del mismo hospedador, no pudo apreciarse un gran número de perfiles asociados específicamente a una especie vegetal (Tabla I.1). Cabe destacar que para cubrir el mayor rango de diversidad posible, se seleccionaron finalmente 72 cepas para los estudios filogenéticos, incluyendo en algunos casos varias cepas representantes de un mismo perfil RAPD.

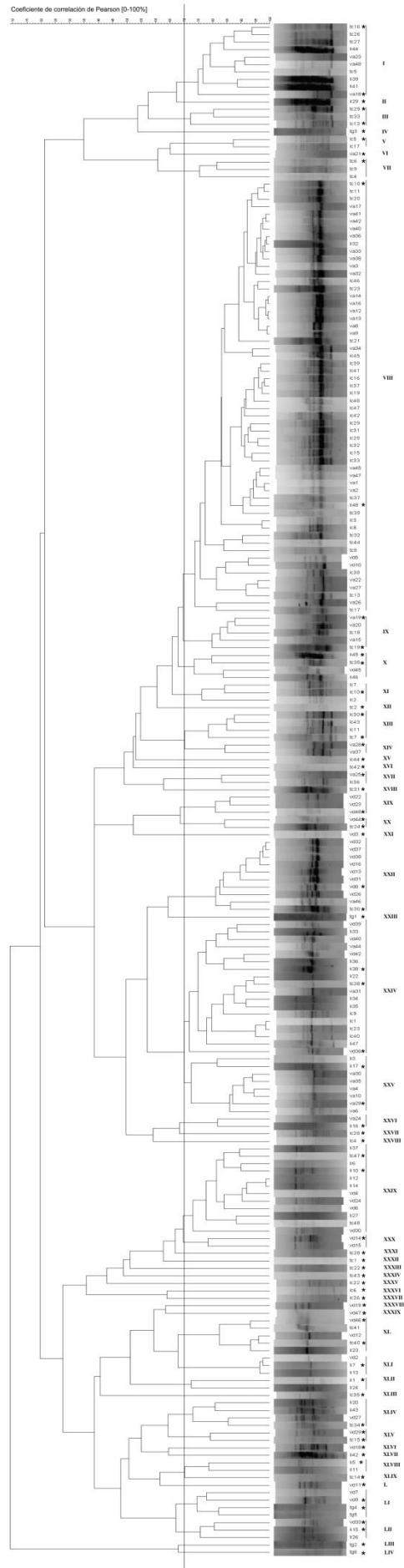


Figura I.1. Dendrograma obtenido en base a los perfiles RAPD de los rizobios aislados. En el análisis se incluyeron las 205 cepas aisladas de los nódulos de *V. sativa* subsp. *angustifolia* (cepas denominadas con el acrónimo va), *V. disperma* (vd), *L. cicera* (lc), *L. intricatus* (li), *T. glomeratum* (tg) y *T. cherleri* (tc). El dendrograma fue generado en base al coeficiente de correlación de Pearson y mediante el algoritmo UPGMA. La línea vertical representa el punto de corte establecido para la delimitación de los grupos RAPD (70%). Los números romanos indican los diferentes grupos o perfiles RAPD obtenidos. Las cepas representativas de cada grupo se encuentran marcadas con un asterisco.

I.3.2. Análisis de genes *core* cromosómicos

I.3.2.1. Análisis del gen *rrs*

El gen *rrs* de las 72 cepas finalmente seleccionadas fue secuenciado con el objetivo de determinar el género al cual pertenecían las mismas. Se obtuvieron secuencias de 1422 pb, con las que se construyó el correspondiente árbol filogenético. Todas las cepas analizadas pertenecieron al grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum* (Figura I.2), la especie tipo del género *Rhizobium*. En base a su secuencia, se delimitaron tres tipos diferentes de este gen, siendo el Tipo 1 el más representado (Tabla I.1). Las cepas asignadas a dicho grupo mostraron una secuencia idéntica a la correspondiente de las cepas tipo de *R. leguminosarum*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*, *R. indigoferae*, *R. sophorae* y *R. acidisoli*, siendo las tres primeras especies citadas capaces de nodular plantas de los géneros *Vicia* o *Trifolium* (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009, Ramírez-Bahena *et al.*, 2009, Saïdi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

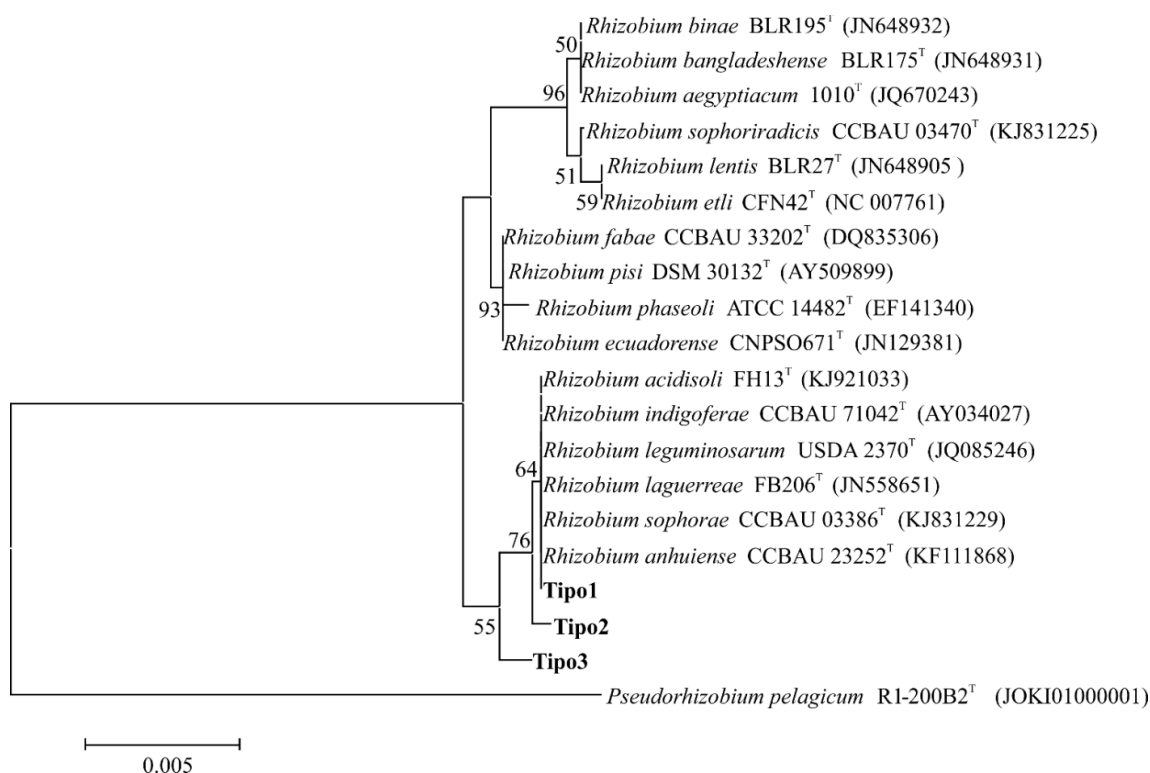


Figura I.2. Árbol filogenético enraizado basado en las secuencias del gen *rrs*. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas en estudio y las cepas tipo de las especies más próximas válidamente descritas para el género *Rhizobium*. Los valores de *bootstrap* fueron calculados para 1000 réplicas, indicándose en los correspondientes nodos tan solo aquellos valores ≥ 50 . La barra representa sustituciones de 5 por cada 1000 nucleótidos. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *rrs* se indican en la Tabla I.1, y entre paréntesis se muestra el número de acceso de las cepas tipo en la base de datos GenBank®.

La secuencia del gen *rrs* de Tipo 2 resultó diferente en tan solo un nucleótido a aquella representativa del Tipo 1, mostrando una identidad del 99.93% con respecto a la secuencia de las especies que conforman el grupo filogenético de *R. leguminosarum* (*R. leguminosarum*, *R. laguerreae*, *R. anhuiense*, *R. indigoferae*, *R. sophorae* y *R. acidisoli*) y aquellas de Tipo 1. De igual forma, el tipo minoritario del gen *rrs* (Tipo 3) mostró 3 nucleótidos diferentes respecto a la secuencia de los otros dos grupos, siendo

Resultados

el porcentaje de identidad del 99.78% con las cepas tipo más próximas, es decir, con las del grupo filogenético de *R. leguminosarum*.

El elevado porcentaje de identidad observado para este gen entre las diferentes especies del grupo filogenético de *R. leguminosarum* y las cepas en estudio hace absolutamente necesario el análisis de otros genes para poder lograr una mayor resolución a nivel intragenérico.

Capítulo I

Tabla I.1. Características moleculares de las cepas representantes de cada grupo RAPD.

Cepa ^a	Grupo RAPD	Tipo <i>rrs</i>	Tipo <i>recA</i>	Tipo <i>atpD</i>	Tipo <i>glnI</i>	Cepa tipo más próxima (<i>recA</i>)	Cluster o linaje ^b	Cepa tipo más próxima (<i>atpD</i>)	Cluster o linaje ^c	Cepa tipo más próxima (<i>glnI</i>)	Cluster o linaje ^d	sv. ^e	Tipo <i>nodC</i>	Cluster o linaje ^f
Cepas aisladas de <i>V. sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i> , <i>V. disperma</i> , <i>L. cicera</i> y <i>L. intricatus</i>														
vd19	XXXVIII	1	1	1	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	viciae	16	IV
vd46	XL	1	1	1	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	viciae	16	IV
lc13	III	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	13	V
va19	IX	1	1	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	3	I
va29	XXV	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	5	II
lc28	XXVII	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	3	I
lc4	XXXVIII	1	1	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	16	IV
li10	XXIX	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
lc22	XXXV	1	1	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
lc6	XXXVI	1	1	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	16	IV
vd47	XXXIX	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
vd29	XLV	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
li42	XLVII	1	1	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	1	I
vd11	L	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
va18	I	1	2	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	7	II
lc5	V	1	2	2	3	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	4	I
va21	VI	1	2	2	3	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	4	I
va28	XIV	1	2	2	3	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
va25	XVII	1	2	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	5	II
lc26	XXXVII	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	viciae	8	VI
vd18	XLVI	1	2	2	3	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	8	VI
li29	II	1	3	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	viciae	10	VII
vd14	XXX	1	3	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	14	III
lc35	XLIII	1	3	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	viciae	7	II
vd33	LII	1	3	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	viciae	15	IV
li38	XXIV	1	6	13	8	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	viciae	11	X
li7	XLI	1	6	13	8	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	viciae	11	X
vd44	XX	1	7	14	6	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	viciae	14	III
li1	XLII	1	7	14	6	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	viciae	11	X
vd36	XXIV	1	9	14	6	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	viciae	9	IX
li5	XLVIII	2	16	4	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	9	IX
li48	VIII	2	16	4	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	8	VII
li45	X	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I
lc10	XI	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I
lc44	XV	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I
vd8	XXII	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I
li17	XXV	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I
li16	XXVI	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	12	VIII
li20	XLIV	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I
li15	LII	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	viciae	1	I

Resultados

vd48	XIX	3	4	9	7	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	III	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	III	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	viciae	2	I
lc30	XIII	3	10	6	13	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VII	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	V	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	viciae	6	II
vd3	XXI	3	10	6	13	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VII	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	V	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	viciae	6	II
vd9	LI	3	14	10	11	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	V	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	III	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	viciae	1	I
Cepa ^a	Grupo RAPD	Tipo rrs	Tipo recA	Tipo atpD	Tipo glnII	Cepa tipo más próxima (recA)	Cluster o linaje ^b	Cepa tipo más próxima (atpD)	Cluster o linaje ^c	Cepa tipo más próxima (glnII)	Cluster o linaje ^d	sv. ^e	Tipo nodC	Cluster o linaje ^f
Cepas aisladas de <i>T. glomeratum</i> y <i>T. cherleri</i>														
tg3	IV	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	14	IV
tc6	VII	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	3	I
tc19	IX	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	14	IV
tc31	XVIII	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	11	IV
tc30	XXII	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	3	I
tc47	XXIX	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	11	IV
tc28	XXXI	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	11	IV
tc1	XXXII	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	7	I
tc34	XLIV	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	9	III
tg4	LI	1	1	2	1	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	14	IV
tc16	I	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	trifolii	12	IV
tc29	III	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	trifolii	12	IV
tc2	XII	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	trifolii	2	I
tc38	XXIV	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	trifolii	2	I
tc22	XXXIII	1	2	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	13	IV
tc43	XXXIV	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	trifolii	12	IV
tc14	XLIX	1	2	2	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	2	I
tg2	LIII	1	2	2	5	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	III	trifolii	12	IV
tc15	XLV	1	3	3	2	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	I	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	I	trifolii	1	I
tg1	XXIII	1	8	14	6	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	II	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	IV	trifolii	4	I
tc35	X	2	15	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	trifolii	8	II
tc10	VIII	2	16	5	4	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VIII	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	VI	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	II	trifolii	8	II
tc7	XIII	3	5	7	9	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	III	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	III	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	trifolii	6	I
tg6	LIV	3	10	12	13	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VII	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	IV	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	trifolii	10	IV
tc42	XVI	3	13	12	13	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	IV	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	IV	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	trifolii	6	I
tc24	XX	3	12	11	10	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	VI	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	III	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	trifolii	5	I
tc40	XL	3	11	8	12	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	V	<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	III	<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	V	trifolii	6	I

^a Los acrónimos de las cepas hacen referencia al hospedador del que fueron aisladas: va, *V. sativa* subsp. *angustifolia*; vd, *V. disperma*; lc, *L. cicera*; li, *L. intricatus*; tc, *T. cherleri*; tg, *T. glomeratum*.

^b Cluster o grupo y/o linaje independiente del gen *recA*.

^c Cluster o grupo y/o linaje independiente del gen *atpD*.

^d Cluster o grupo y/o linaje independiente del gen *glnII*.

^e sv., simbiovar determinado en base a las secuencias del gen *nodC*.

^f Cluster o grupo y/o linaje independiente del gen *nodC*.

I.3.2.2. Análisis de genes *housekeeping*

En la actualidad varios son los genes *housekeeping* empleados para la identificación de especies bacterianas, si bien según el género en estudio se analizan diferentes genes. En el caso de *Rhizobium* y más concretamente de las especies filogenéticamente relacionadas con *R. leguminosarum*, los genes más frecuentemente empleados para una adecuada identificación de especies son los *housekeeping* *recA* y *atpD*, aunque en los últimos años el gen *glnII* se postula como una herramienta adicional igualmente resolutive (Jiao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Román-Ponce *et al.*, 2016).

En los tres casos se observó una gran diversidad, reflejada en los 16, 14 y 13 tipos diferentes de los genes *recA*, *atpD* y *glnII*, respectivamente. Con el objetivo de agrupar las cepas más similares, aquellas representativas de un mismo tipo de gen fueron agrupadas en *clusters* con valores de identidad internos superiores al 97%.

Las secuencias del gen *recA* resultaron ser parafiléticas y fueron agrupadas en cinco grupos filogenéticos y tres linajes independientes (Figura I.3). Todas las cepas en estudio se encontraban formando un clado bien definido con alto valor de *bootstrap* (86%), si bien la resolución interna del mismo no fue tan clara. De forma similar, las secuencias de los genes *atpD* y *glnII* correspondientes a las cepas analizadas también formaron grupos parafiléticos, observándose cuatro *clusters* y dos linajes independientes en el caso del *atpD* y tres *clusters* y dos linajes independientes para el gen *glnII* (Figuras I.4 y I.5). La topología de los árboles basados en los tres genes *housekeeping* muestran la proximidad filogenética de las cepas aisladas de *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* con especies del grupo filogenético de *R. leguminosarum*, confirmando los resultados obtenidos tras el análisis del gen *rrs*.

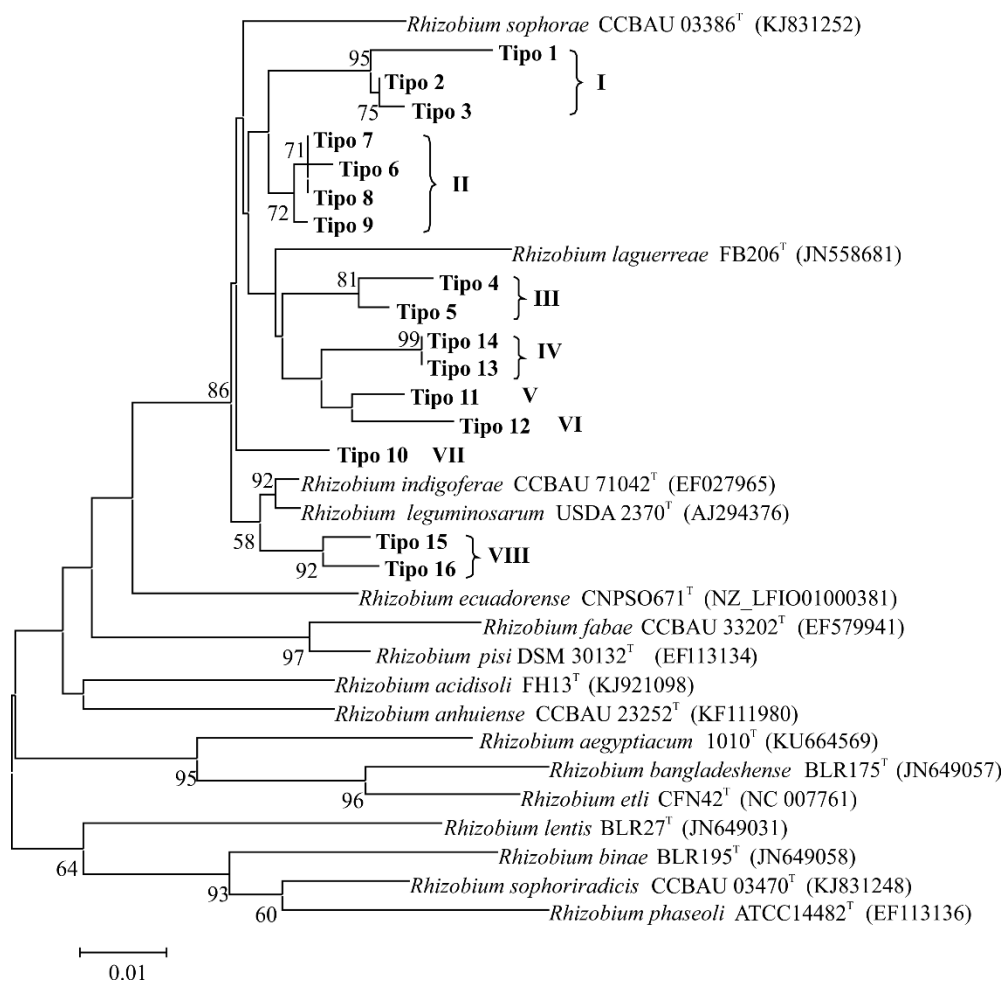


Figura I.3. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *recA*. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas en estudio y las cepas tipo de las especies más próximas válidamente descritas para el género *Rhizobium*. Los valores de *bootstrap* fueron calculados para 1000 réplicas, indicándose en los correspondientes nodos tan solo aquellos valores ≥ 50 . La barra representa sustituciones de 1 nucleótido por cada 100. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *recA* se indican en la Tabla I.1, y entre paréntesis se muestra el número de acceso de las cepas tipo en la base de datos GenBank®. En números romanos se indica el *cluster* o grupo y los linajes independientes a los que pertenecen las cepas aisladas en este trabajo.

Teniendo en cuenta la filogenia basada en los genes cromosómicos de las cepas analizadas (Figuras I.2-5), se pudo apreciar que las cepas pertenecientes al Tipo 1 del gen *rrs* se agrupaban en el *cluster* I de los tres genes *housekeeping* y algunas de las cepas, en el linaje independiente III del gen *glnII*. Las cepas agrupadas en el *cluster* I de los tres genes mostraron un porcentaje de identidad inferior al 98, 97 y 98%, respectivamente, de los genes *recA*, *atpD* y *glnII* respecto a las cepas tipo de las especies más próximas, es decir, de *R. leguminosarum*, *R. laguerreae* y *R. leguminosarum*, respectivamente. Cabe destacar que aquellas cepas representativas del linaje III del gen *glnII* mostraron un valor de identidad relativamente bajo respecto al correspondiente gen de *R. laguerreae* FB206^T (< 95.8%), y que a pesar de que el tipo de *rrs* era el mismo que el de las cepas del *cluster* I, la divergencia filogenética respecto a estas quedó patente (95% de identidad; Figura I.5). Por otro lado, el resto de cepas representativas del Tipo 1 de *rrs* se agruparon en el *cluster* II (*recA* y *atpD*) y *cluster* IV del gen *glnII*, mostrando porcentajes de identidad inferiores a 98, 96 y 95% con las

correspondientes secuencias de *R. leguminosarum* USDA 2370^T (*recA*) y *R. laguerreae* FB206^T (*atpD* y *glnII*).

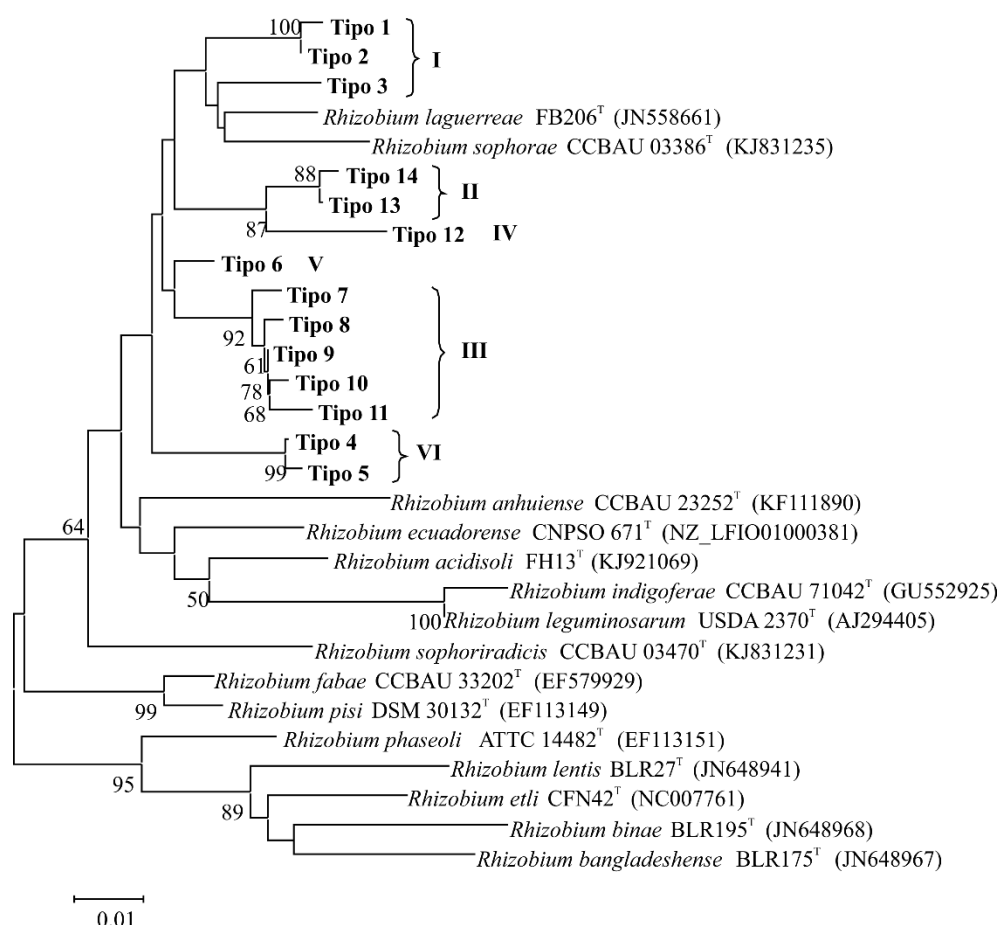


Figura I.4. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *atpD*. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas en estudio y las cepas tipo de las especies más próximas válidamente descritas para el género *Rhizobium*. Los valores de *bootstrap* fueron calculados para 1000 réplicas, indicándose en los correspondientes nodos tan solo aquellos valores ≥ 50 . La barra representa sustituciones de 1 nucleótido por cada 100. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *atpD* se indican en la Tabla I.1, y entre paréntesis se muestra el número de acceso de las cepas tipo en la base de datos GenBank®. En números romanos se indica el *cluster* o grupo y los linajes independientes a los que pertenecen las cepas aisladas en este trabajo.

La distribución de las cepas que presentaban el Tipo 2 del *rrs* resultó consistente con aquella obtenida en base a los tres genes *housekeeping* analizados. Todas las cepas que mostraban este tipo de gen *rrs* se agruparon en único linaje independiente según el gen *glnII* (linaje II) así como en un único *cluster* de *recA* y *atpD* (*clusters* VIII y VI, respectivamente; Figuras I.3 y I.4). En estos dos últimos casos, las secuencias de las cepas en análisis resultaron muy similares, siendo el nivel de identidad interna superior a 98% en ambos casos. Pese a que la cepa tipo filogenéticamente más próxima fue *R. leguminosarum* USDA 2370^T según el análisis de los genes *recA* y *glnII* (> 98% identidad), el gen *atpD* tan solo mostró un 96% de identidad con el correspondiente gen de la cepa tipo más cercana, esto es, *R. laguerreae* FB206^T.

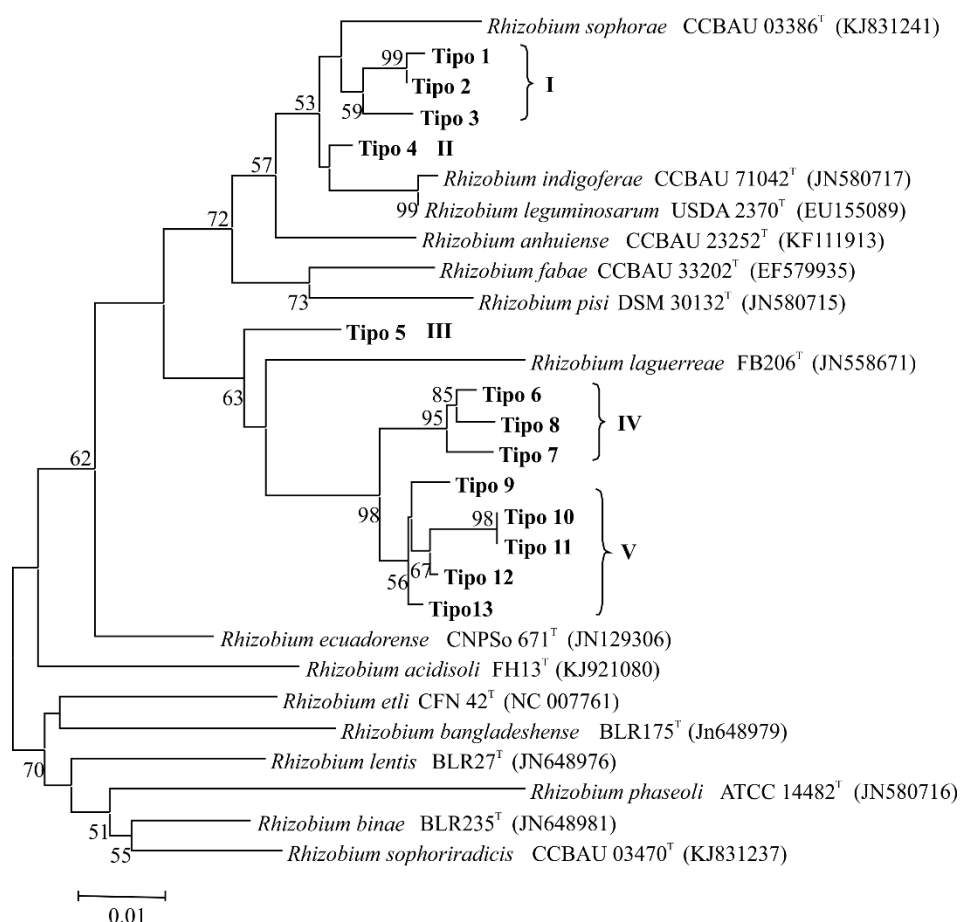


Figura I.5. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *glnII*. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas en estudio y las cepas tipo de las especies más próximas válidamente descritas para el género *Rhizobium*. Los valores de *bootstrap* fueron calculados para 1000 réplicas, indicándose en los correspondientes nodos tan solo aquellos valores ≥ 50 . La barra representa sustituciones de 1 nucleótido por cada 100. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *glnII* se indican en la Tabla I.1, y entre paréntesis se muestra el número de acceso de las cepas tipo en la base de datos GenBank®. En números romanos se indica el *cluster* o grupo y los linajes independientes a los que pertenecen las cepas aisladas en este trabajo.

La filogenia obtenida en base a los tres genes *housekeeping* considerados de las cepas cuyo gen *rrs* era del Tipo 3, exhibió mayor número de conflictos internos en cuanto al posicionamiento de las cepas en los árboles correspondientes. Tal y como se aprecia en las Figuras I.3-5, estas cepas se agruparon en los *clusters* III y IV y linajes independientes V-VII del gen *recA*, en el *cluster* III y linajes independientes IV y V del *atpD* y *cluster* V y linaje IV del restante gen *housekeeping* analizado. Las especies conocidas más próximamente relacionadas fueron *R. sophorae* y *R. laguerreae* según los genes *atpD* y *glnII*, respectivamente, con menos de un 97% de identidad respecto a las cepas tipo correspondientes, en ambos casos. En tanto, todas las cepas que presentaban el Tipo 3 del gen *rrs* mostraron una identidad del gen *recA* inferior a 98% al correspondiente gen de *R. leguminosarum* USDA 2370^T. Sin embargo, se pudieron apreciar discordancias entre los diversos genes analizados. Es de remarcar el hecho de que las cepas incluidas en el *cluster* III del gen *atpD* (y que por ende mostraban más de un 97% de identidad interna) se agruparon en diferentes linajes independientes y *clusters* de los otros genes *housekeeping* (*cluster* III y linajes V-VI del gen *recA*; *clusters* IV y V del gen *glnII*). A su vez, las cepas que mostraban los Tipos 6 y 10 de los genes

atpD y *recA* constituían linajes independientes (V y VII, respectivamente), agrupándose en el *cluster* V del gen *glnII* en el cual a su vez se agrupan cepas pertenecientes a otros grupos o linajes relativos a los otros genes *housekeeping* (Tabla I.1).

I.3.3. Análisis del gen auxiliar *nodC*

I.3.3.1. Determinación de simbiopares

Para la determinación de los simbiopares a los que pertenecen los endosimbiontes en estudio se analizó el gen *nodC*, determinante del rango de hospedadores de los rizobios.

Tal y como se muestra en la Figura I.6, las cepas en estudio se encontraban agrupadas en dos clados bien definidos y con un valor de 100% de *bootstrap*, siendo la identidad de la secuencia entre las cepas ubicadas en una y otra rama inferior a 90%. Aquellos rizobios aislados del interior de los nódulos de las raíces de *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. resultaron filogenéticamente próximos a cepas tipo de diferentes especies, pero pertenecientes todas ellas al simbiopar *viciae*, quedando definida su adscripción a dicho simbiopar. Por el contrario, todas aquellas cepas aisladas de los tréboles (*T. glomeratum* y *T. cherleri*) pertenecieron al sv. *trifolii*. Estas resultaron agrupadas en dos *clusters* y dos linajes independientes incluidos en el clado en el que se encontraban las cepas adscritas a esta simbiopariedad, como *R. leguminosarum* ATCC 14880 (Figura I.6). Pese a que en lo que refiere a cada simbiopar el nivel de identidad interna fue superior al 90%, la diversidad observada para este gen fue elevada. Concretamente, entre las cepas pertenecientes al sv. *viciae* se distinguió un total de 16 tipos de *nodC*, mientras que 14 tipos distintos fueron registrados para aquellas adscritas al sv. *trifolii*.

El análisis filogenético de este gen reveló que las cepas aisladas en este trabajo pertenecientes al sv. *viciae* se agrupaban en tres *clusters* – cada uno de ellos con más de un 97% de identidad interna – y hasta siete linajes independientes. Tal y como se desprende de la topología del correspondiente árbol filogenético (Figura 1.6), algunas cepas se encontraban próximamente relacionadas con determinadas especies del grupo filogenético de *R. leguminosarum*. Por ejemplo, la cepa que mostraba el Tipo 15 de *nodC* (*cluster* IV) quedó agrupada con las cepas tipo de *R. binae* y *R. laguerreae* (99.85 y 100% de identidad, respectivamente), mientras que aquellas del mismo *cluster* que mostraban el Tipo 16 se encontraban próximas a la cepa tipo de *R. anhuiense* (> 99.41%). En tanto, las cepas aisladas de los nódulos de *Trifolium* mostraron niveles de identidad inferiores respecto a la secuencia del gen *nodC* de las cepas filogenéticamente más cercanas, encontrándose los valores de identidad entre el 95.49% y el 97.23% en el caso del Tipo 3, con respecto a *R. leguminosarum* ATCC 14880, *R. aegyptiacum* 1010^T y *R. pisi* 3.22.

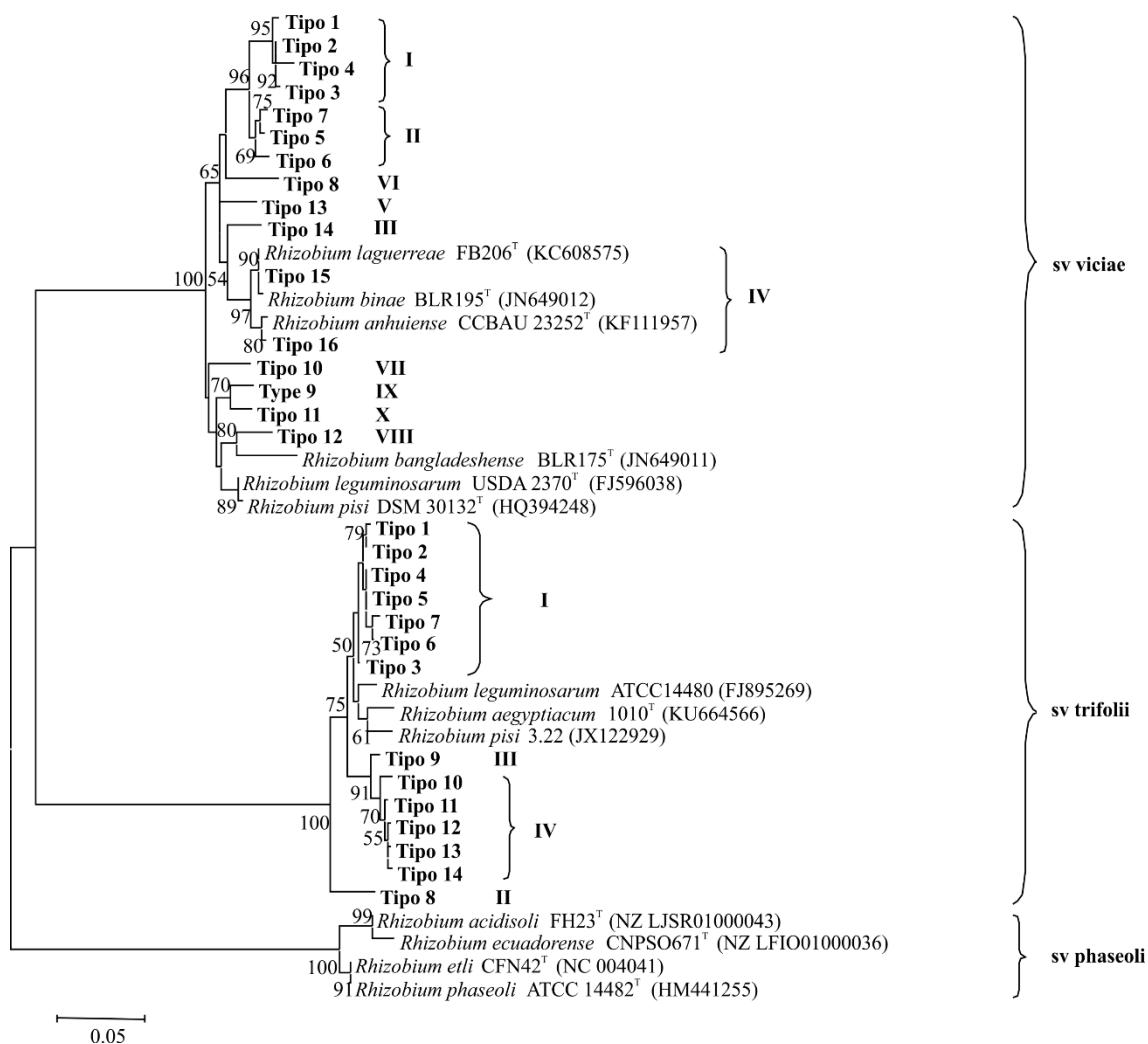


Figura I.6. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nodC*. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas en estudio y las cepas más próximas adscritas a los simbiotipos viciae, trifolii y phaseoli. El árbol fue validado mediante 1000 réplicas de *bootstrap* indicando los valores ≥ 50 en los correspondientes nodos. La barra representa sustituciones de 5 por cada 100 nucleótidos. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *nodC* se indican en la Tabla I.1, y entre paréntesis se muestra el número de acceso de las cepas de referencia en la base de datos GenBank®. En números romanos se indica el *cluster* o grupo y los linajes independientes a los que pertenecen las cepas aisladas en este trabajo. sv, simbiovar.

I.3.3.2. Análisis biogeográfico

Con el objeto de estudiar los patrones biogeográficos de las variantes del gen *nodC* de las cepas en estudio, las secuencias de estas fueron comparadas con las respectivas de cepas aisladas en diversos puntos geográficos.

Así, la topología del árbol filogenético obtenido para las cepas adscritas al simbiovar viciae reveló la agrupación de las mismas en nueve *clusters* y un linaje independiente (Figura I.7). Concretamente, la secuencia del gen de nodulación de estas mostró similitud con la correspondiente a diferentes especies rizobianas aisladas hasta en cuatro continentes distintos. En los *clusters* I y II las cepas aisladas del Parque Nacional de Sierra Nevada se agruparon con cepas aisladas de diferentes especies del género *Vicia* en otras regiones de España y Marruecos, y de nódulos de *Lens culinaris*

en Turquía. Bajo el *cluster* III se agruparon cepas aisladas en este trabajo con cepas aisladas en otras zonas de España, Bélgica, China e incluso Corea del Sur y Perú a partir de nódulos de diferentes especies de *Vicia* y *Lathyrus*, si bien todas ellas pertenecían a *R. leguminosarum*. Dichas cepas también resultaron filogenéticamente próximas (en cuanto al gen *nodC*), a una cepa aislada de planta de guisante (*Pisum sativum*) en India. Las cepas agrupadas en el *cluster* IV mostraron un origen geográfico diverso, siendo aisladas hasta en cuatro continentes distintos y a partir de una considerable variedad de hospedadores (*Pisum sativum*, *Lens culinaris* y ocho especies diferentes del género *Vicia*). Por el contrario, la diversidad geográfica de las cepas incluidas en los *clusters* V, VI, VII, IX y X fue menor, siendo aisladas en Marruecos o diferentes países de Europa, y a partir de los mismos géneros vegetales que las mencionadas del *cluster* IV (Figura I.7). Destaca el Tipo 12 del sv. *viciae* el cual formó el linaje independiente VIII, siendo hasta el momento de escritura de este trabajo detectado exclusivamente en cepas aisladas del género *Lathyrus* en el Parque Nacional de Sierra Nevada (Granada, España).

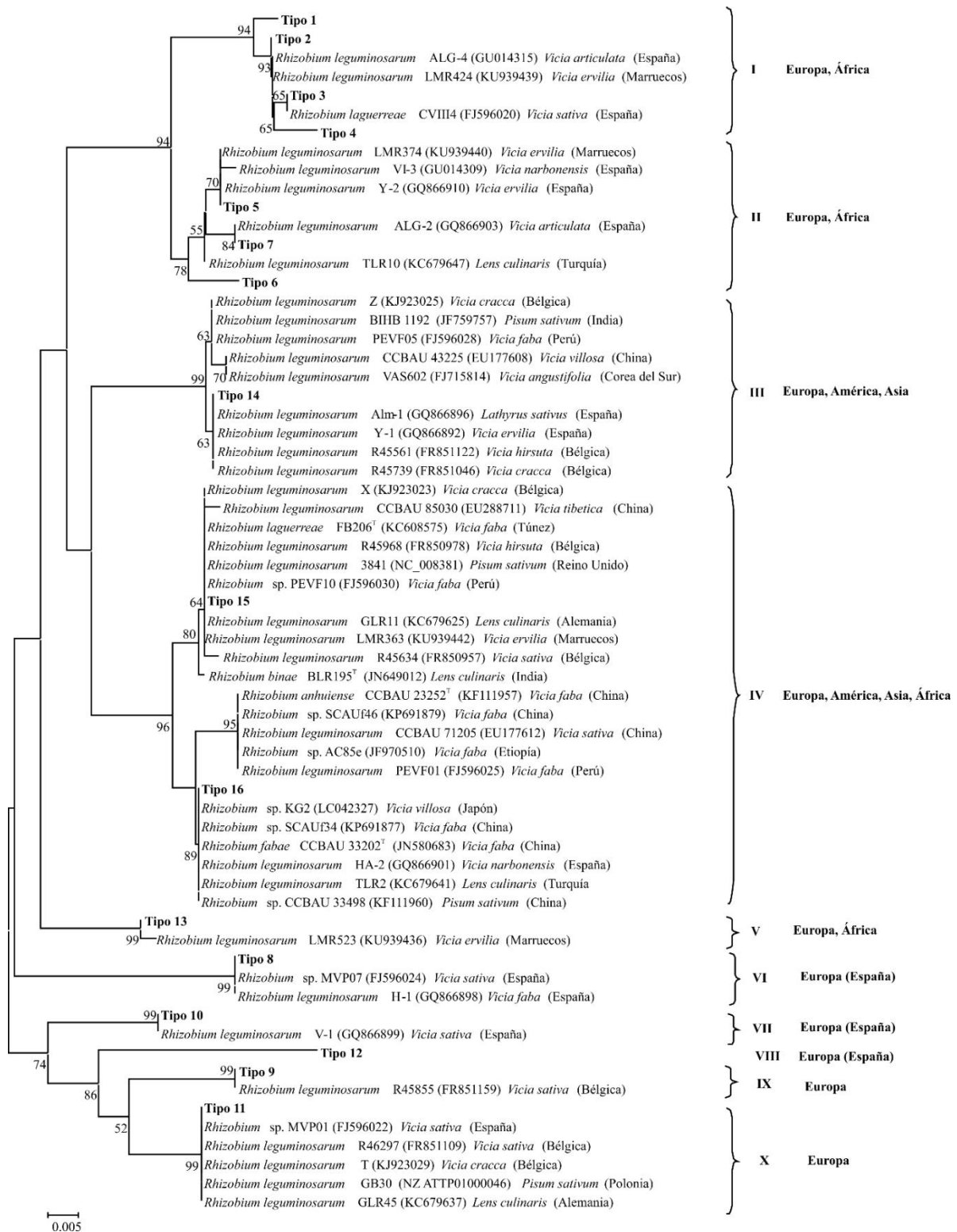


Figura I.7. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nodC* incluyendo las cepas del simbiovar *viciae* aisladas en este trabajo y en otras localizaciones geográficas. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining y validado mediante 1000 réplicas de *bootstrap* indicando los valores ≥ 50 en los correspondientes nodos. La barra representa sustituciones de 5 por cada 1000 nucleótidos. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *nodC* se indican en la Tabla I.1. Tras el nombre de cada cepa de referencia se indica, por orden, el correspondiente número de acceso en la base de datos GenBank® (entre paréntesis), la especie vegetal de la que fue aislada primitivamente y el país donde fue aislada (entre paréntesis). En números romanos se indica el *cluster* o grupo y el linaje independiente al que pertenecen las cepas aisladas en este trabajo.

Las cepas del sv. *trifolii* obtenidas del interior de los nódulos de *T. glomeratum* y *T. cherleri* se agruparon con cepas de la especie *R. leguminosarum* aisladas de diferentes especies del género *Trifolium* exclusivamente en el continente europeo. En total se formaron dos *clusters* y dos linajes independientes, tal y como se aprecia en el árbol filogenético correspondiente (Figura I.8). Así pues, los rizobios aislados en el Parque Nacional de Sierra Nevada incluidos en el *cluster* I mostraron proximidad filogenética con otros aislados de tres especies diferentes del género *Trifolium* en Toledo (España), Bélgica, y Grecia. Aquellas cepas agrupadas en el *cluster* IV procedían del Parque Nacional de Sierra Nevada, Toledo, Ciudad Real (España) y Grecia. Por otro lado, las cepas representantes de los Tipos 8 y 9 del gen *nodC* formaron linajes independientes sin mostrar proximidad filogenética a ninguna cepa perteneciente a este simbiovar aislada en otro país.

Resultados

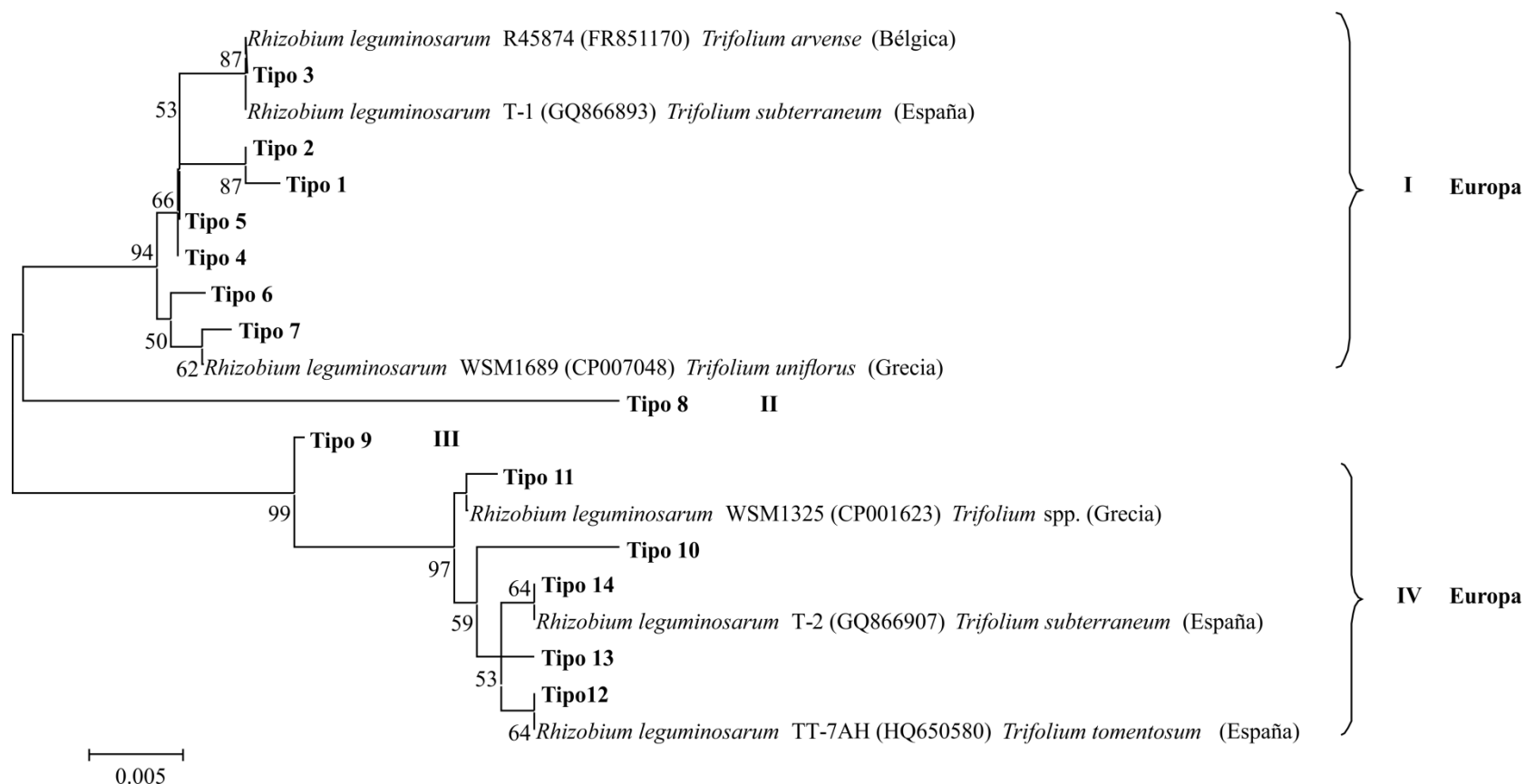


Figura I.8. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nodC* incluyendo las cepas del simbiovar *trifolii* aisladas en este trabajo y en otras localizaciones geográficas. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining y validado mediante 1000 réplicas de *bootstrap* indicando los valores ≥ 50 en los correspondientes nodos. La barra representa sustituciones de 5 por cada 1000 nucleótidos. Las cepas pertenecientes a cada tipo de gen *nodC* se indican en la Tabla I.1. Tras el nombre de cada cepa de referencia se indica, por orden, el correspondiente número de acceso en la base de datos GenBank® (entre paréntesis), la especie vegetal de la que fue aislada primitivamente y el país donde fue aislada (entre paréntesis). En números romanos se indica el *cluster* o grupo así como los linajes independientes a los que pertenecen las cepas aisladas en este trabajo.

I.3.4. Ensayos de nodulación cruzada

Con el objetivo de caracterizar en mayor medida los endosimbiontes estudiados, se llevaron a cabo experimentos de reinfección del hospedador del que fueron aislados, así como ensayos de nodulación cruzada. Para ello, además de las cepas *R. leguminosarum* sv. *viciae* USDA 2370^T y *R. leguminosarum* sv. *trifolii* ATCC 14480 (noduladoras de plantas del grupo de inoculación cruzada de *Vicia* y *Trifolium*, respectivamente), se seleccionaron las cepas vd8, va21, lc6, li29, tc1 y tg6 pertenecientes a las simbiovares *viciae* y *trifolii*, y aisladas cada una de ellas de uno de los hospedadores vegetales en análisis (ver Tabla I.1).

vd8, va21, lc6, li29 y *R. leguminosarum* sv. *viciae* USDA 2370^T fueron capaces de formar nódulos determinados en las raíces de las plantas de los géneros *Vicia* y *Lathyrus* (Figura I.9 A, B y C), y por ende, de nodular también la especie hospedadora de la que fueron aisladas. Por el contrario, ninguna de ellas resultó noduladora de los dos tréboles estudiados.

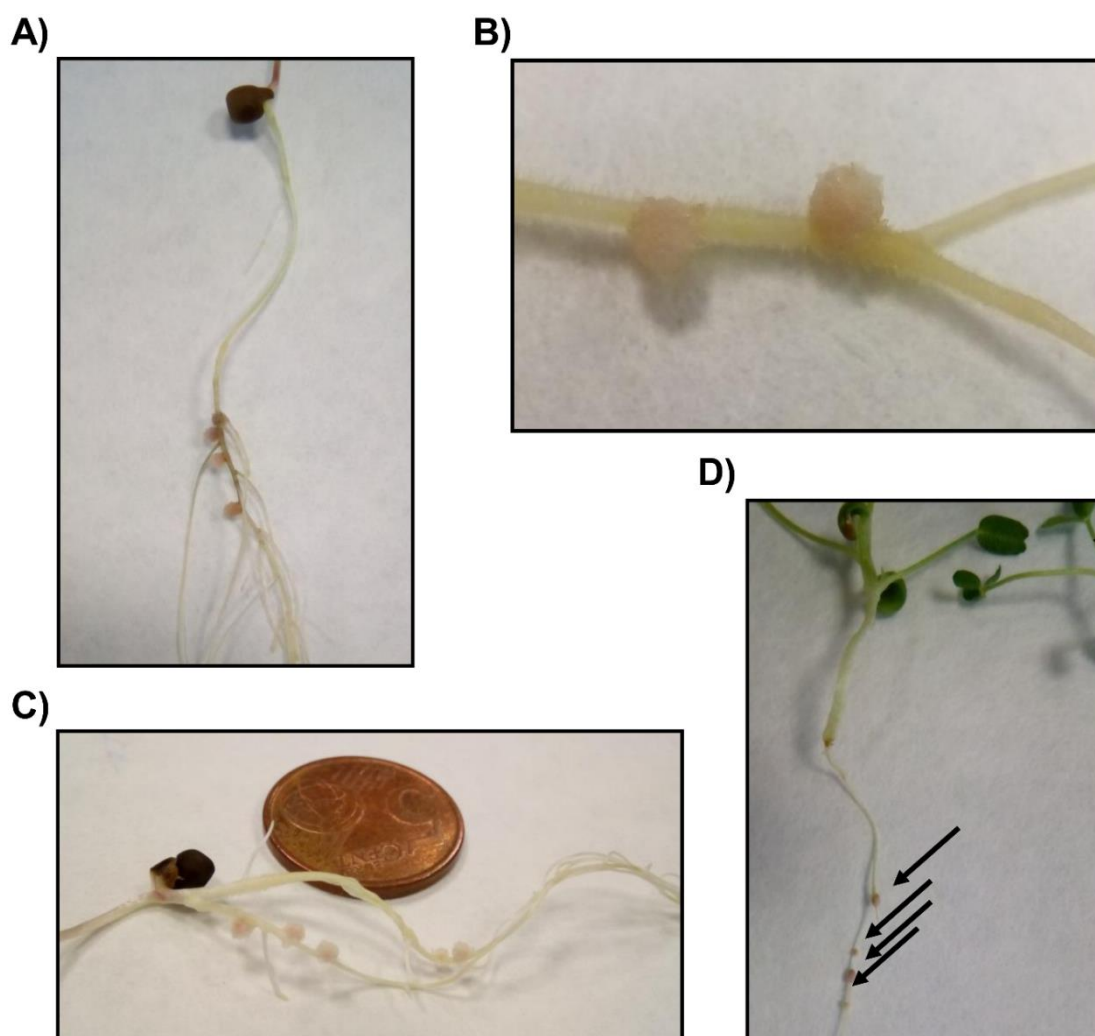


Figura I.9. Sistema radicular de las plantas de *L. intricatus* inoculadas con la cepa lc6 (A) y detalle de los nódulos formados en las raíces de dicho hospedador tras la inoculación de la cepa vd8 (B) y *R. leguminosarum* sv. *viciae* USDA 2370^T (C). Planta de *T. glomeratum* inoculada con la cepa tc1 (D). Las flechas señalan pequeños nódulos de color rosáceo.

Resultados

De igual manera, *T. glomeratum* y *T. cherleri* fueron exclusivamente noduladas por las cepas tc1, tg6 y *R. leguminosarum* sv. trifolii ATCC 14480 en los dos casos, no siendo las cepas aisladas de *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. ni la cepa tipo de *R. leguminosarum* capaces de formar nódulos en las raíces de los tréboles en estudio. Tanto tc1 como tg6 fueron capaces de nodular plantas de *T. cherleri* y *T. glomeratum*, respectivamente, esto es, de reinfectar su hospedador de origen. En la Figura I.9 D se muestran los nódulos formados por la cepa tc1 en las raíces de una planta de *T. glomeratum*.

Cabe destacar que todos los nódulos observados en las raíces de los seis hospedadores considerados eran de color rosa-rojizo, aspecto indicativo de la fijación activa de N₂ atmosférico. A su vez, las plantas que resultaron noduladas mostraron un aspecto saludable de la parte aérea, no habiendo indicios de carencias de N, único elemento requerido por las plantas pero no aportado en la solución nutritiva empleada.

I.4. Discusión

La diversidad genotípica de rizobios aislados de diferentes especies de leguminosas ha sido estudiada en numerosas ocasiones mediante la técnica de genotipado RAPD dado que los perfiles obtenidos son específicos de cepa (Rivas *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2006; Santillana *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; Aoki *et al.*, 2010; Durán *et al.*, 2013; Cobo-Díaz *et al.*, 2014; Díaz-Alcántara *et al.*, 2014). Los 54 perfiles RAPD observados para las 205 cepas aisladas en este trabajo revelan la gran diversidad genotípica de las mismas aun habiendo sido aisladas de la misma parcela experimental. Otros autores han demostrado previamente la diversidad genotípica existente entre cepas del género *Rhizobium* obtenidas en regiones geográficamente próximas (Santillana *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009), e incluso de cepas aisladas de dos nódulos adyacentes del mismo rizoma de plantas de *Lathyrus japonicus* (Aoki *et al.*, 2010). Así pues, los resultados obtenidos en este trabajo confirman la amplia diversidad genotípica del género *Rhizobium* incluso cuando se trata de cepas aisladas en un mismo punto geográfico. A su vez, no se observó una asociación específica entre los perfiles RAPD y las especies vegetales de las que los endosimbiontes fueron obtenidos, así como tampoco grupos RAPD específicos de una geno especie puntual. Concretamente, determinadas cepas que resultaron idénticas en cuanto a la secuencia del gen *rrs*, *recA*, *atpD* y *glnII*, poseían diferente *background* genómico, como es el caso de las cepas caracterizadas por los Tipos 2, 16, 5 y 4 de los mencionados genes cromosómicos, respectivamente. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Durán y colaboradores (2013), quienes remarcan que la identidad de la secuencia del gen *recA* de cepas con el mismo *background* genómico es del 100%, si bien en dicho caso se trataba de endosimbiontes del género *Bradyrhizobium*. Así pues, los resultados obtenidos en este trabajo permiten reiterar que los perfiles RAPD son específicos de cepa y útiles por tanto para el estudio de la diversidad genotípica a nivel infraespecífico de una población amplia de rizobios.

La sistemática actual de este grupo de bacterias está basada en el análisis preliminar de la secuencia del gen *rrs* con el que clasificar los endosimbiontes a nivel de género. Pese a la gran diversidad de genotipos detectados, la secuencia del gen *rrs* de todas las cepas estudiadas resultó muy similar entre sí, quedando todas ellas clasificadas en el género *Rhizobium*, perteneciente a la familia *Rhizobiaceae*.

Concretamente, todas las cepas mostraron valores de identidad muy elevados respecto a la correspondiente secuencia de las cepas tipo pertenecientes al grupo filogenético de *R. leguminosarum*, llegando a ser las del Tipo 1 idénticas a las de varias especies diferentes que conforman dicho grupo. Por tanto, los resultados del análisis del gen *rrs* tan solo permitieron confirmar la adscripción de las cepas aisladas al género *Rhizobium*.

En la actualidad, la taxonomía de los rizobios se fundamenta en el análisis adicional de otros genes cromosómicos como los *housekeeping* para la clasificación de los mismos a nivel de especie (Gaunt *et al.*, 2001). En concreto, la resolución intragenérica alcanzada mediante el análisis de ciertos genes *housekeeping* como el *recA*, *atpD* y *glnII* es superior a la lograda únicamente con el gen *rrs* en el caso del género *Rhizobium*. La comparación de dichos genes con los respectivos de las cepas tipo de las especies con las que las cepas en estudio mostraron mayor similitud en cuanto al gen *rrs*, únicamente permitió confirmar los resultados obtenidos para el análisis del gen ribosomal. Es decir, tan solo fue posible determinar que las cepas en estudio se encuentran filogenéticamente próximas a aquellas que componen el grupo filogenético de *R. leguminosarum*. Sin embargo, las cepas relativas al Parque Nacional de Sierra Nevada no pudieron ser asignadas a ninguna especie conocida del género *Rhizobium* ya que la similitud de los genes *housekeeping* con respecto a aquellos de las especies filogenéticamente más próximas fue similar o incluso inferior a la similitud existente entre diferentes especies (97%).

Varios autores han demostrado previamente que cepas que muestran entre sí una identidad total de la secuencia del gen ribosomal, poseen genes *housekeeping* muy diversos (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; García-Fraile *et al.*, 2010). Este mismo hecho pudo ser observado en las cepas aisladas en este trabajo, siendo remarcable la divergencia filogenética entre las cepas del linaje III (gen *glnII*) y el resto de cepas que mostraban idéntico gen *rrs* (Tipo 1). Además, en este caso, según el gen considerado el nivel de similitud respecto a las especies filogenéticamente más próximas (*R. leguminosarum* y *R. laguerreae*) fue cercano o incluso inferior al descrito entre especies diferentes, por lo que las cepas del Tipo1 del *rrs* no pudieron ser identificadas con ninguna especie conocida.

Asimismo, las cepas que poseían el Tipo 3 de *rrs* y se agrupaban en el *cluster* III del *housekeeping atpD* con un nivel de identidad interna superior al 97%, mostraron genes *recA* y *glnII* divergentes filogenéticamente. En este sentido, varias discordancias fueron detectadas entre la filogenia basada en los genes *recA*, *atpD* y *glnII*. La gran proporción de cepas que pertenecían a diferentes linajes dependiendo del gen considerado así como la distribución de algunas de ellas en diferentes *clusters*, hace muy difícil la identificación taxonómica de las cepas en estudio, y por tanto la afiliación taxonómica de las mismas no resultó concluyente.

Así pues, las inconsistencias entre los genes *housekeeping* observadas en este trabajo sugieren la posible transferencia horizontal de DNA cromosómico entre cepas, y la subsecuente recombinación genética. La diferente distribución filogenética en base a los genes *recA* y *atpD* ha sido previamente constatada para cepas próximas a *R. leguminosarum* aisladas de *Pisum sativum* (Santillana *et al.*, 2008). Así pues, las inconsistencias entre genes detectadas en las cepas aisladas del Parque Nacional de Sierra Nevada y en otros trabajos, ponen de manifiesto que la situación taxonómica de

Resultados

las genopecies incluidas en el grupo filogenético de *R. leguminosarum* debería ser revisada en un futuro.

Por otro lado, cabe destacar que las cepas que mostraron el Tipo 2 de *rrs* se agruparon en los mismos *clusters* de *recA* y *atpD* y el mismo linaje relativo al gen *glnII*. Si bien en este caso no se apreciaron discrepancias en cuanto a la distribución filogenética de las cepas, estas no pudieron ser identificadas con ninguna especie conocida del género *Rhizobium*. Pese a la gran similitud de los genes *recA* y *glnII* de las cepas en estudio con los respectivos genes de *R. leguminosarum* USDA 2370^T (> 98%), el bajo porcentaje de identidad del gen *atpD* mostrado con la especie conocida más próxima (*R. laguerreae*, < 96%) y las diferencias observadas en cuanto al gen ribosomal sugieren que dichas cepas podrían corresponder a una nueva especie del género *Rhizobium*.

Algunas cepas pertenecientes al grupo filogenético de *R. leguminosarum* han sido previamente aisladas de leguminosas de los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium*. Uno de los endosimbiontes más comunes de dichos géneros es *R. leguminosarum* (Jordan, 1984; Aoki *et al.*, 2010; Rogel *et al.*, 2011; Saïdi *et al.*, 2014), si bien otra especie como *R. anhuiense* ha sido también aislada de nódulos de plantas de los tres citados géneros (Tong *et al.*, 2018). La diversidad taxonómica de rizobios noduladores tanto de especies cultivadas como silvestres de estos géneros vegetales es amplia. Concretamente, han sido aisladas e identificadas numerosas especies diferentes como *R. fabae* y *R. pisi* a partir de *V. faba* o *V. sativa* (Tian *et al.*, 2008; Rogel *et al.*, 2011), *R. laguerreae* (*V. faba*, *T. uniflorum*; Saïdi *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2018), *R. multihospitium* (*V. hirsuta* y *L. odoratus*; Han *et al.*, 2008), *R. hidalgonense* (*T. semipilosum*; Tong *et al.*, 2018), *R. acidisoli* (*T. polymorphum*; Tong *et al.*, 2018), *R. bangladeshense* y *R. aegyptiacum* de *T. alexandrinum* (Shamseldin *et al.*, 2016), además de las incluidas en las Figuras I.7 y I.8. Sin embargo, la diversidad de rizobios aislados de las leguminosas silvestres analizadas en este trabajo no ha sido descrita en profundidad hasta el momento de redacción de esta memoria de Tesis. Cabe destacar que Nonnoi y colaboradores (2012) caracterizaron genotípicamente y trataron de identificar taxonómicamente rizobios aislados de nódulos de *T. glomeratum* en base a la secuencia del gen *rrs*, si bien no analizaron ninguno de los genes *housekeeping* recomendados para la descripción de especies del género *Rhizobium*.

Gracias al análisis del gen de nodulación *nodC* es posible distinguir tres simbiovariedades entre las cepas pertenecientes a *R. leguminosarum*. Los endosimbiontes más comunes capaces de nodular ejemplares de los géneros *Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* y *Lens* pertenecen al simbiovar *viciae*, siendo *trifolii* el característico de las cepas noduladoras del género *Trifolium* y *phaseoli* el que con mayor frecuencia nodula *Phaseolus* (García-Fraile *et al.*, 2010). Tal y como era de esperar, la secuencia del gen de nodulación permitió diferenciar los endosimbiontes de *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. de aquellos aislados de los nódulos de los tréboles por su adscripción a los simbiovars *viciae* y *trifolii*, respectivamente. Al mismo tiempo, las cepas pertenecientes a un determinado simbiovar fueron capaces de nodular exclusivamente las plantas del mismo grupo de inoculación cruzada de aquellas de las que fueron aisladas. Todo ello apunta a que las cepas estudiadas *in planta* tienen un rango de hospedadores limitado, siendo capaces de nodular dos y cuatro especies vegetales en el caso de las cepas del

simbiovar *trifolii* y *viciae*, respectivamente. Sin embargo, la amplitud del rango de hospedadores de las cepas en estudio debería determinarse realizando ensayos de nodulación cruzada adicionales con mayor número de especies de leguminosas. Los resultados obtenidos además son consistentes con la afiliación de las plantas estudiadas a tribus consideradas como hospedadores restrictivos, esto es, Fabeae y Trifoliae (Peix *et al.*, 2015).

Por otro lado, pese a tratarse de cepas aisladas de un mismo origen geográfico pudo observarse el gran polimorfismo del gen de nodulación, demostrado por el abundante número de tipos de *nodC* diferentes detectados en cada uno de los simbiovars, así como por la agrupación de las cepas en diferentes *clusters* e incluso linajes independientes. El gran nivel de diversificación de este gen quedó reflejado también en los diferentes tipos de *nodC* que mostraron cepas que poseían secuencias idénticas de los tres genes *housekeeping*. Dicha inconsistencia entre la filogenia basada en los genes cromosómicos y el gen accesorio analizado podría ser atribuida a la frecuente transferencia de los genes simbióticos, como el *nodC*, entre cepas de rizobios (Suominen *et al.*, 2001). Al mismo tiempo, cepas asignadas a un mismo tipo de *nodC* resultaron ser filogenéticamente divergentes según los genes *housekeeping* analizados.

En este sentido, la secuencia del gen *nodC* de la mayoría de cepas aisladas de *Vicia* spp., *Lathyrus* spp. y *Trifolium* spp. resultó idéntica o altamente similar a la respectiva de cepas aisladas de otros hospedadores en otros países, incluso en otros continentes. Este fenómeno ha sido documentado anteriormente para cepas del simbiovar *viciae* (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; Flores-Félix *et al.*, 2019), lo que sugiere que dichos endosimbiontes podrían tener un origen filogenético común a pesar de haber sido aislados en localizaciones geográficas diferentes. Además, la distribución (a lo largo incluso de diferentes continentes) de cepas que portan la misma variante del gen *nodC* pone de manifiesto la diversidad filogenética del gen de nodulación. Todo ello sumado a que algunos tipos de *nodC* fueron detectados exclusivamente para las cepas procedentes del Parque Nacional de Sierra Nevada permite concluir que el nivel de diversificación del gen de nodulación es elevado en los diferentes ecosistemas.

Así pues, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los endosimbiontes de las leguminosas analizadas que forman parte de la flora forrajera naturalmente presente en el Parque Nacional de Sierra Nevada, son genotípicamente muy diversos y pertenecen al género *Rhizobium*. El análisis de los genes cromosómicos permitió clasificar las cepas en el grupo filogenético de *R. leguminosarum*. Sin embargo, ninguna de ellas pudo ser identificada a nivel de especie considerando el nivel de similitud establecido entre diferentes especies y las incongruencias detectadas entre los distintos genes *housekeeping*. Por el contrario, en base al gen de nodulación las cepas aisladas de *Vicia* spp. y *Lathyrus* spp. fueron clasificadas en el simbiovar *viciae*, perteneciendo al simbiovar *trifolii* aquellas obtenidas de los nódulos de las plantas del género *Trifolium*. A su vez, las cepas adscritas a cada simbiovar fueron capaces de nodular las plantas del mismo grupo de inoculación cruzada del hospedador del que fueron aisladas, pero no mostraron habilidad de nodulación cruzada. Finalmente, el alto grado de diversificación del gen *nodC* quedó reflejado en la gran similitud entre las cepas en estudio y otras aisladas en diferentes países e incluso continentes, así como en la

exclusividad de la secuencia de este gen mostrada por algunas de las cepas del Parque Nacional de Sierra Nevada.

I.5. Perspectivas futuras

Ante la incapacidad de determinar la especie de pertenencia de las cepas aisladas de plantas de los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* mediante el análisis realizado, otras técnicas experimentales deberían implementarse para precisar la identidad a nivel de especie de las mismas. Durante las últimas décadas, la hibridación DNA-DNA (DDH, *DNA-DNA hybridization*) ha sido la técnica de elección para determinar indirectamente el nivel de similitud de una pareja de genomas¹³. El DDH ha sido considerado como el estándar de oro para la descripción de especies bacterianas, ya que ha permitido establecer un punto de corte numérico para la identificación de especies. Cepas con un nivel de similitud genómica inferior al 70% según esta técnica se considera que pertenecen a especies distintas (Wayne *et al.*, 1987). Los ensayos de hibridación han sido frecuentemente implementados en estudios de sistemática de rizobios para la definición de nuevas especies así como para alcanzar una mayor resolución interespecífica en el caso de cepas que muestran una elevada similitud del gen *rrs* pero secuencias divergentes de los genes *housekeeping* (Valverde *et al.*, 2006; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; entre otros). Por este motivo se considera que mediante ensayos de hibridación entre el DNA genómico de las cepas en estudio y el correspondiente de las cepas tipo de las especies filogenéticamente más próximas (según el análisis de genes *core*), se puede lograr la identificación de las mismas.

Sin embargo, la técnica DDH es conocida por su inherente dificultad experimental, con lo que nuevas alternativas han sido desarrolladas con el objetivo de reemplazar esta herramienta por otras más sencillas y fiables (Stackebrand *et al.*, 2002). Dado el abaratamiento de los precios de la secuenciación masiva y el consecuente aumento en el número de genomas secuenciados, una alternativa sería comparar las secuencias genómicas de las cepas aisladas con aquellas depositadas en las bases de datos. En la actualidad es posible calcular varios índices de similitud, los cuales se encuentran basados en comparaciones *in silico* genoma-genoma. Uno de los índices más frecuentemente analizados es el denominado ANI (*Average Nucleotide Identity*,

¹³ Las técnicas de reasociación permiten calcular la similitud genómica en base a la estabilidad del híbrido de DNA de doble cadena obtenido tras desnaturalizar una mezcla de DNA genómico e incubar posteriormente dicha mezcla en condiciones astringentes que permiten la renaturalización de secuencias complementarias. Si bien todas las técnicas de hibridación DNA-DNA se basan en que la estabilidad del dúplex de DNA genómico de un organismo y otro será mayor cuanto más similar sea la composición de bases del mismo, existen diferentes estrategias para realizar los ensayos de reasociación. A su vez, fundamentalmente dos parámetros son los que se determinan mediante estas técnicas: el ratio de unión relativa (RBR, *Relative Binding Ratio*) y/o la variación de la temperatura de *melting* o fusión (ΔT_m), en comparación con el correspondiente homólogo. Para profundizar en las diferentes técnicas y su aplicabilidad en la sistemática bacteriana se recomienda consultar la revisión exhaustiva realizada por Rosselló-Móra y colaboradores (2011).

Identidad nucleotídica promedio)¹⁴, el cual es llamado a ser el próximo estándar en la delimitación de especies dado que refleja de forma robusta el nivel de distancia evolutiva entre la pareja de genomas comparados (Goris *et al.*, 2007). En el momento de escritura de esta Tesis la secuencia genómica de las cepas *R. leguminosarum* USDA 2370^T, *R. laguerreae* FB206^T y *R. sophorae* CCBAU 03386^T (es decir, de las especies filogenéticamente más próximas a las cepas en estudio), se encuentra disponible en las bases de datos EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017) y GenBank® (Benson *et al.*, 2013). Así pues, para aproximar la identidad de las especies a las que pertenecen las cepas aisladas de *Vicia* spp., *Lathyrus* spp. y *Trifolium* spp. podría secuenciarse el genoma de varias de estas cepas y calcular los valores ANI con respecto a las cepas tipo mencionadas.

Paralelamente, en base a los resultados obtenidos se considera que el estado taxonómico del género *Rhizobium* y en concreto del grupo filogenético de *R. leguminosarum* debería ser revisado en futuros estudios. Si bien en el caso de los rizobios el rango taxonómico de subespecie no se encuentra válidamente aceptado según los estándares actuales de la sistemática, la descripción de dicha categoría infraespecífica podría contribuir a clarificar la situación taxonómica de las diferentes geno-especies halladas en este trabajo. La descripción de subespecies podría encontrarse especialmente indicada para aquellas cepas cuyo fondo genético es diferente pero no divergen lo suficiente como para considerarse especies distintas.

¹⁴ Se trata de una medida de la identidad promedio existente entre una pareja de genomas. Dicha identidad es posible calcularla comparando todos los genes ortólogos codificantes compartidos en ambos genomas o bien comparando fragmentos aleatorios de 1020 nucleótidos independientemente de si se trata de regiones codificantes o no. Ambos métodos proporcionan resultados similares y son igualmente válidos y resolutivos (Goris *et al.*, 2007). El potencial de esta técnica en estudios taxonómicos es tal que ya ha sido determinada la correlación entre el índice ANI y los valores convencionalmente obtenidos mediante ensayos DDH, siendo equivalente un índice del 94% (ANI) con un nivel de similitud del 70% según los ensayos de reasociación de DNA (Richter y Roselló-Móra, 2009).



CAPÍTULO II

Definición y descripción del core procarioma de la rizosfera de
Quercus pyrenaica

La imagen muestra el paisaje otoñal en el Espacio Natural de Sierra Nevada.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

II.1. Introducción

II.1.1. Importancia del estudio de la microbiota asociada a especies forestales

Las bacterias del suelo han sido objeto de estudio de la microbiología durante siglos, y a pesar del gran esfuerzo realizado a nivel global por comprender múltiples aspectos relativos a su ecología, los numerosos avances realizados en este campo han permitido conocer tan solo una ínfima parte de la diversidad de las mismas. Dicha falta de conocimiento tiene su origen en que las bacterias del suelo son uno de los organismos más abundantes y diversos de la Tierra (Gans *et al.*, 2005), siendo por tanto difícilmente abordable la caracterización de las propiedades ecológicas de miles de taxones diferentes. Por consiguiente, en la actualidad la inmensa mayoría de las bacterias del suelo no han podido ser cultivadas *in vitro* y se dispone de información genómica de una cantidad relativamente pequeña de las mismas (Land *et al.*, 2015). Todo ello conduce a que muchas de las características ecológicas, la contribución con la funcionalidad del ecosistema en el que habitan o las propiedades metabólicas de las mismas, entre otros aspectos, sean a día de hoy una gran incógnita. En el caso concreto de las bacterias que habitan los suelos forestales – incluida la rizosfera de los árboles – el desarrollo de las tecnologías *high throughput* o de alto rendimiento (en su mayoría, técnicas *meta-ómicas*) han permitido concluir que las comunidades microbianas son enormemente diversas (Uroz *et al.*, 2016; Lladó *et al.*, 2017). Sin embargo, pese a que gracias a los avances metodológicos se ha logrado arrojar algo de luz sobre la diversidad, dinámica de las comunidades microbianas, así como sobre la respuesta de las mismas a cambios ambientales o a perturbaciones del ecosistema, dichas poblaciones no han sido aún tan detalladamente estudiadas como las correspondientes a los ecosistemas agrícolas (Li *et al.*, 2014). El conocimiento sobre las características ecológicas de los microorganismos que forman parte de la microbiota forestal facilitaría el aislamiento y cultivo *in vitro* de los mismos. Ello, a su vez, permitiría a la comunidad científica realizar postulaciones o predicciones más certeras sobre la variación de la estructura de las poblaciones microbianas en respuesta a diversos factores e incluso a alteraciones ecosistémicas. Además, un mayor conocimiento de la ecología y fisiología de los principales microorganismos permitiría tener un mejor gobierno de los mismos, y por ejemplo, promover determinadas propiedades funcionales deseadas (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018).

Gran cantidad de aspectos relacionados con la funcionalidad de los ecosistemas forestales – véase el contenido en nutrientes del suelo – difieren entre los distintos tipos de bosques, principalmente debido a las diferencias en la tasa de deposición primaria, la calidad de la hojarasca, los exudados radiculares, el efecto de los herbívoros, entre otros (Hackl *et al.*, 2005; Haichar *et al.*, 2008). De igual manera, es sabido que la composición de las comunidades asociadas a las raíces o a la parte aérea de un hospedador vegetal puede ser diferente en función de la especie e incluso del genotipo de la planta hospedadora (Philippot *et al.*, 2013). De todo ello se desprende que, ante el deseo de implementar abordajes biotecnológicos basados en el empleo de microorganismos asociados a un hospedador concreto, es necesario estudiar caso a caso. O lo que es lo mismo, analizar la comunidad microbiana concreta que habita, por ejemplo, la rizosfera de la especie leñosa en estudio, en el ecosistema considerado.

II.1.2. Las comunidades procariotas prácticamente olvidadas: las comunidades activas

Durante los últimos años se ha observado un incremento en el número de trabajos destinados al estudio del procarioma o bacterioma de diferentes hospedadores vegetales (Lundberg *et al.*, 2012; Peiffer *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015; Zarraonaindia *et al.*, 2015; Coleman-Derr *et al.*, 2016), entre los que se incluye la especie leñosa *Q. pyrenaica* (Cobo-Díaz *et al.*, 2017). La mayoría de este tipo de trabajos son llevados a cabo mediante técnicas de *metabarcoding*¹⁵, amplificando y secuenciando parcialmente el gen *rrs* y analizando posteriormente los perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas. Sin embargo, la presencia de un microorganismo en un determinado ecosistema no implica necesariamente que este se encuentre activo, considerando como *activos* aquellos que se hallan involucrados en un proceso metabólico, dispuestos a estarlo inmediatamente, en crecimiento o en fase de división. En el suelo y en la rizosfera, las células procariotas pueden encontrarse además formando parte de la necromasa (células muertas, no viables), o bien en estado reversible de dormancia con un metabolismo fuertemente reducido (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013). Así pues, la mayoría de trabajos sobre diversidad procariota o bacteriana se fundamentan en el análisis de amplicones del gen *rrs*, centrándose por tanto en las correspondientes poblaciones totales independientemente del estatus de actividad de las células. Sin embargo, debe remarcarse que este tipo de abordajes no permiten distinguir entre células activas, muertas o en dormancia, DNA ambiental o DNA extracelular preservado de forma estable en el suelo, adsorbido sobre minerales arcillosos o propio de los biofilms (Pietramellara *et al.*, 2009; Steinberger y Holden, 2005). Empero, son precisamente los microorganismos metabólicamente activos los que podrían encontrarse ejerciendo un efecto (directo o indirecto, positivo o negativo) sobre el *fitness* del hospedador, o encontrarse implicados en los procesos ecosistémicos. Tal es así que la diversidad de la población metabólicamente activa se encuentra relacionada positivamente con la funcionalidad de un ecosistema como el suelo, en mayor medida de lo que se encuentra la comunidad microbiana total (Bastida *et al.*, 2016).

II.1.2.1. Estrategias destinadas al análisis de las comunidades procariotas activas

Dada la importancia de los procariotas que participan activamente en los distintos procesos metabólicos en la rizosfera de un hospedador, ciertas técnicas se han implementado a lo largo de los últimos años para identificar aquellos miembros de una comunidad que son activos. Entre estas se incluyen el marcaje con sales de tetrazolio (Hatzinger *et al.*, 2003), marcaje con isótopos estables (Coyotzi *et al.*, 2016) o bien análisis de metatranscriptómica (Moran *et al.*, 2013) o metaproteómica (Bastida *et al.*, 2016). Una de ellas está basada en la secuenciación del cDNA obtenido tras la retrotranscripción de los transcritos del gen *rrs* (de ahora en adelante denominados

¹⁵ Teniendo en cuenta las consideraciones de Creer y colaboradores (2016) y Deiner y colaboradores (2016), las técnicas de *metabarcoding* son aquellas que persiguen la identificación taxonómica de múltiples especies que componen una mezcla de muestras. Las técnicas de *metabarcoding* se basan en una amplificación inicial por PCR de un gen o marcador concreto mediante el empleo de *primers* específicos o universales, y en la subsiguiente secuenciación masiva de los productos obtenidos empleando una plataforma de alto rendimiento (454 de Roche, Illumina, Ion Torrent, etc.).

rRNA) puesto que se trata de un componente estructural de los ribosomas e implicado por tanto en la síntesis proteica. Además, junto con la inestabilidad o corto periodo de vida del RNA en el suelo, y la consecuente elevada tasa de reemplazo del mismo, el *rRNA* se convierte en un marcador ideal para el estudio de las comunidades procariotas que potencialmente se encuentran sintetizando proteínas en un momento puntual, y que por tanto tienen mayor probabilidad de ser metabólicamente activas o encontrarse relacionadas con el funcionamiento del ecosistema rizosférico (Romanowicz *et al.*, 2016).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la presencia de *rRNA* no siempre es indicativa de un estado de actividad metabólica, ya que ha sido demostrado que células en dormancia pueden acumular un alto contenido de ribosomas en su interior para retomar la síntesis proteica en condiciones concretas (Nanamiya *et al.*, 2010). Opuestamente, algunas especies hacen un acopio de ribosomas precisamente antes de entrar en fase de dormancia (Nanamiya *et al.*, 2010). Por otro lado, debe remarcarse que tampoco la cantidad de *rRNA* es un buen marcador de la fase de crecimiento bacteriano, ya que no para todos los taxones se aprecia una relación lineal entre ambos parámetros (Blazewicz *et al.*, 2013).

Así pues, una alternativa más prometedora a analizar exclusivamente el *rRNA* consiste en comparar la abundancia del mismo y del correspondiente gen *rrs* (*rDNA* de aquí en adelante). Es esperable que cuando la actividad metabólica incrementa, lo haga también la proporción entre ambos tipos de ácidos nucleicos, debido a que la cantidad de ribosomas aumenta mucho más que el número de copias genómicas del *rrs* en las células activas (Steven *et al.*, 2017). La relativización de la abundancia del *rRNA* con respecto a la del *rDNA* (cuyo cociente es expresado como el ratio *rRNA:rDNA*) es una estrategia directa para realizar dicha comparación.

La bondad de la aplicación del mencionado cociente para estimar el estado de actividad de las células ha sido cuestionada en determinadas ocasiones. El diferente número de copias genómicas del gen *rrs* entre taxones, la ausencia de conocimiento sobre la cantidad de ribosomas que caracteriza cada estado fisiológico de las células, así como las diferentes tasas de crecimiento, han sido los principales factores que han puesto en duda la fiabilidad de dicho ratio (Steven *et al.*, 2017). Sin embargo, la validez de la relación *rRNA:rDNA* ha sido contrastada recientemente a través de diversos métodos. Así, Bowsher y colaboradores (2019) demostraron que mediante el cálculo del ratio y mediante tinción con el indicador de la respiración celular CTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) es posible obtener patrones comparables de actividad. Los mismos autores además revelaron que la corrección del número de copias del gen *rrs* no tiene un efecto sustancial a la hora de estimar el estado de actividad de las células.

Así pues, el análisis comparado de ambos tipos de ácidos nucleicos se muestra como una herramienta prometedora que permitiría obtener una visión más amplia y detallada de las comunidades procariotas asociadas a hospedadores vegetales, por ejemplo, especies forestales. No obstante, el ratio *rRNA:rDNA* debe considerarse un indicador del potencial de las células para sintetizar proteínas, y no de la síntesis proteica finalmente llevada a cabo. Se muestra útil, por tanto, para clasificar las células procariotas como potencialmente activas.

Teniendo en cuenta todo lo anterior y la revisada relevancia del holobionte en un ecosistema concreto (ver Apartado 2), para llevar a cabo tareas de restauración forestal basadas en microorganismos es preciso en primer lugar analizar los perfiles taxonómicos de la microbiota asociada a la especie leñosa concreta y el ecosistema en estudio, incluyendo las comunidades microbianas potencialmente activas.

II.2. Diseño experimental

El avanzado estado de degradación actual de las masas boscosas de *Q. pyrenaica* hace que sea necesario el desarrollo de abordajes destinados a la mejora de las formaciones existentes o a la repoblación de zonas montañosas con esta especie leñosa. La implementación de estrategias basadas en microorganismos – como puede ser el desarrollo de inoculantes bacterianos – requiere el estudio previo de la diversidad y los perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas asociadas al hospedador. Así pues, se estudió el procarioma rizosférico del roble melojo en el ecosistema del Parque Nacional de Sierra Nevada, buscando definir la comunidad procariota permanente de dicha especie leñosa, con independencia de características propias de los individuos hospedadores o características ambientales específicas. Al objeto de obtener un perfil más detallado sobre el holobionte, tanto las comunidades procariotas totales como la fracción potencialmente activa fueron consideradas en el estudio.

Para identificar aquellos taxones que de forma estable forman parte del procarioma rizosférico, se desarrolló una estrategia basada en el estudio de las comunidades procariotas asociadas a robles heterogéneos en cuanto a su edad y tipo de formación o estructura en la que se agrupan. Concretamente, se seleccionaron las zonas HAF, XZF y BRF del término municipal de Cáñar, en las cuales se localiza, respectivamente, un melojar maduro con abundantes individuos longevos, pies aislados de roble melojo de aproximadamente 50 años de edad, y un bosque de segunda repoblación compuesto por individuos de roble melojo de aproximadamente 17 años. Los detalles específicos de cada zona de muestreo se encuentran en el Apartado M.1.

En cada área se seleccionaron tres subáreas, y en cada una de ellas, a su vez, se tomaron muestras de suelo del entorno radicular de tres árboles, conforme se detalla previamente (Apartado M.2.1.). El muestreo fue realizado durante primavera de 2013, obteniéndose un total de 27 muestras.

Por una parte, se determinaron las propiedades fisicoquímicas del suelo bajo influencia de las raíces de los robles considerados. Por otro lado, con el objetivo de poder estudiar las comunidades procariotas que se hallaban potencialmente activas en el momento de muestreo, así como las poblaciones procariotas totales que habitan la rizosfera de cada árbol, se llevó a cabo una co-extracción de DNA y RNA a partir de cada una de las muestras tomadas. De esta forma se pretendió estudiar en paralelo ambos tipos de poblaciones y así poder correlacionar los perfiles taxonómicos obtenidos en los dos casos.

Posteriormente se llevó a cabo la transcripción reversa del RNA rizosférico y sucesivas reacciones hasta la obtención de ds-cDNA. A continuación, se procedió a la construcción de librerías de amplicones del gen *rrs*, basadas, de forma independiente, en DNA y ds-cDNA (de aquí en adelante denominadas *librerías de DNA* y *librerías de*

RNA, respectivamente). La preparación de las mismas fue realizada mediante amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3-V4-V5 de dicho gen. Inicialmente el DNA y el ds-cDNA procedente de cada árbol fue amplificado por triplicado obteniéndose un total de 162 productos de PCR. Las tres réplicas técnicas correspondientes a cada árbol fueron posteriormente mezcladas, reduciéndose el número de muestras a 27 por cada tipo de ácido nucleico en estudio. A continuación, las nueve mezclas compuestas relativas a cada subárea fueron mezcladas. Gracias a la inclusión de códigos de barras específicos para las muestras de cada subárea de muestreo, las mezclas fueron realizadas equimolecularmente, obteniéndose dos mezclas o librerías (DNA, RNA) que fueron sometidas a secuenciación masiva. El nivel de replicación fue por tanto de tres réplicas por cada área de muestreo analizada, para cada una de las librerías en estudio. La Figura II.1 muestra esquemáticamente el diseño del experimento llevado a cabo hasta la realización de la pirosecuenciación.

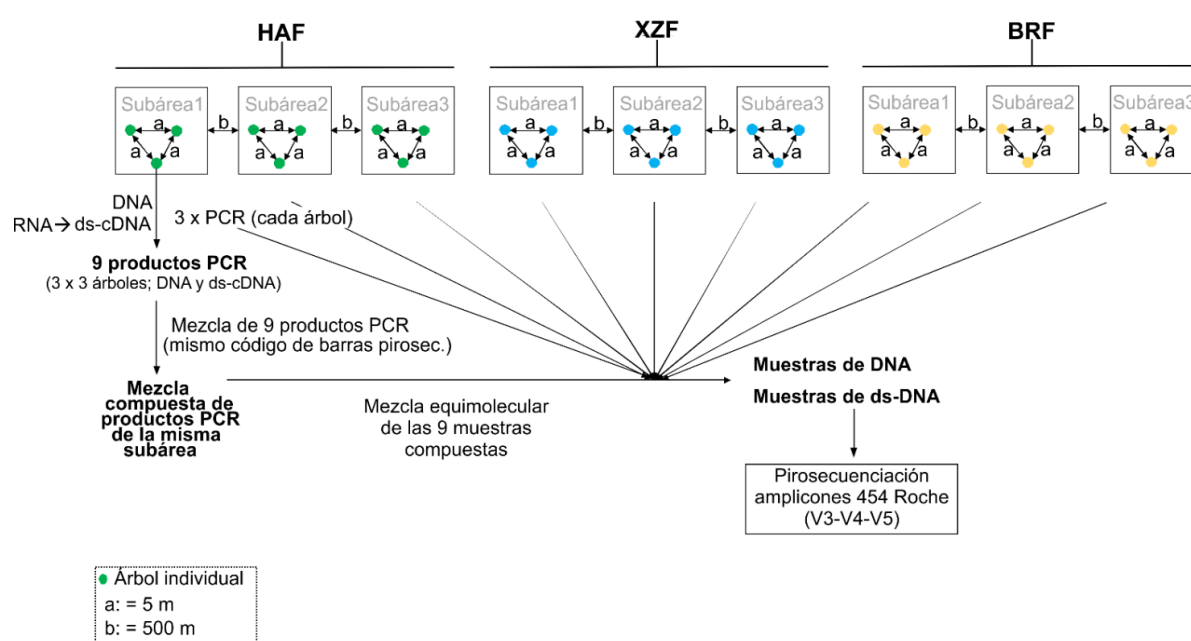


Figura II.1. Esquema del diseño experimental y procesamiento de muestras hasta la pirosecuenciación de amplicones correspondientes a las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen *rrs*. Figura modificada de Lasa y colaboradores (2019a).

Las lecturas obtenidas fueron procesadas bioinformáticamente conforme se detalla en el Apartado M.5.1.2.1., hasta la obtención en última instancia de una tabla de incidencia de cada uno de los OTUs en cada muestra (a un nivel del 3% de distancia genética). En aquellos casos en los que se deseó analizar rangos taxonómicos superiores, los OTUs fueron colapsados al nivel de distancia correspondiente.

El análisis de las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo comenzó con la obtención de las curvas de rarefacción correspondientes a cada una de las muestras. Asimismo, se calculó la cobertura de Good, los índices de diversidad α y se procedió a la comparación de los mismos mediante métodos de estadística univariante paramétricos o no paramétricos (según la distribución y homogeneidad de la varianza de las variables). Cabe destacar que para evitar el efecto del esfuerzo de muestreo y los sesgos relacionados con el diferente tamaño muestral, previo al cómputo

Resultados

de los índices de diversidad α se realizó una rarefacción de los datos al número de secuencias que conformaban la muestra de menor tamaño.

Una vez conocida la riqueza y equidad de las comunidades, los subsecuentes análisis fueron realizados considerando todas las secuencias de calidad obtenidas independientemente del tamaño muestral, siguiendo las recomendaciones de McMurdie y Holmes (2014). Es decir, se consideró el conjunto total de datos sin rarificar. Así pues, se procedió a analizar la diversidad existente entre las comunidades en estudio (diversidad β), basando todos los análisis restantes en la métrica Weighted UniFrac. Al objeto de ahondar en la estructura de las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo, los análisis de diversidad β se encontraron enfocados hacia el estudio de las diferencias existentes entre las comunidades, explicadas tanto por el tipo de librería en estudio, como por el sitio analizado. De esta manera, se consideró el efecto de dos factores (tipo de librería y sitio de muestreo¹⁶) con dos y tres niveles, respectivamente. Para la realización de tales comparaciones se emplearon métodos estadísticos multivariantes con los que evaluar la homogeneidad de la dispersión de los diferentes grupos de muestras, así como la diferencia existente en el centroide de los mismos (test de permutaciones PERMDISP2 y PERMANOVA, respectivamente).

Con el objeto de evaluar la existencia de gradientes ecológicos debidos a gradientes ambientales (propiedades fisicoquímicas del suelo), se aplicó el método interpretativo CAP seguido de la correspondiente validación estadística (variante permutacional de ANOVA, Apartado M.5.4.3.4.3.). Concretamente se analizó la significación tanto del modelo explicativo propuesto como la de cada uno de los factores fisicoquímicos incluidos en el mismo. Analizada la estructura de las comunidades totales y potencialmente activas, se procedió a estudiar los perfiles taxonómicos de las mismas, profundizando en diferentes rangos y considerando la abundancia relativa de cada uno de los taxones. La comparación de la abundancia de los mismos fue realizada en base a test estadísticos univariantes (Apartado M.9.). Fueron empleados, concretamente, test de naturaleza no paramétrica tras confirmar la distribución asimétrica positiva de la abundancia relativa de los taxones en estudio, la cual habitualmente caracteriza las comunidades procariotas que habitan ecosistemas naturales (Wagner *et al.*, 2011).

Tras realizar el análisis preliminar con el que fueron estudiadas la diversidad α y β de las comunidades procariotas de la rizosfera de robles de distinta edad y que conforman diferentes formaciones, se pasó a identificar aquellos taxones comunes o compartidos pese a las diferencias mencionadas. En primer lugar se procedió a la definición del *core* procarioma o procarioma central o esencial tanto de las poblaciones totales como de las potencialmente activas (denominados *core*-DNA y *core*-RNA, respectivamente), para lo cual se tuvo en consideración los criterios de ubicuidad y persistencia detallados en el Apartado M.5.4.6. Reconocidos los OTUs comunes a los tres tipos de árboles considerados, se procedió al estudio de la composición taxonómica del *core*-DNA y *core*-RNA, colapsando dichos OTUs a rangos taxonómicos superiores. Dado el interés en conocer la composición de la subpoblación potencialmente activa en

¹⁶ El factor *sitio de muestreo* posee tres niveles (HAF, BRF y XZF) y por lo tanto representa de forma implícita tanto la edad de los árboles (centenarios, de unos 17-18 y 48 años, respectivamente) como el tipo de formación que conforman (bosque cerrado o maduro, bosque mixto abierto y pies sueltos de roble).

el momento de muestreo de la forma más certera posible, se descartaron posibles *phantom taxa* o taxones fantasma¹⁷ así como OTUs presentes pero para los cuales no fueron detectadas secuencias derivadas del rRNA. A tal fin, se definió el *core*-compartido (Apartado M.5.4.6), considerando como *accesorios* todos aquellos OTUs exclusivamente registrados en una de las dos librerías. Tomando todos los OTUs del *core*-compartido en conjunto, se calculó la correlación existente entre la abundancia relativa de secuencias de rDNA y de secuencias derivadas del rRNA para obtener una visión general del potencial metabólico de dicha comunidad. Finalmente, se procedió al cálculo del cociente rRNA:rDNA de todos los OTUs del *core*-compartido. Si bien el punto de corte adecuado para clasificar los taxones bacterianos como activos todavía no ha sido consensuado aún por la comunidad científica, es conocido que valores conservadores del ratio permiten igualmente obtener perfiles ecológicos consistentes (Kearns *et al.*, 2016; Bowsher *et al.*, 2019). Por ello, se analizaron únicamente aquellos OTUs con un ratio rRNA:rDNA superior o igual a dos.

II.3. Resultados

II.3.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de las raíces de *Q. pyrenaica*

Los suelos analizados fueron del tipo franco-arenoso en el caso de los sitios BRF y XZF, y franco aquel relativo a HAF. Tal y como se detalla en la Tabla II.1, los suelos resultaron ser diferentes estadísticamente en cuanto a algunas de las propiedades fisicoquímicas medidas. El suelo de BRF y XZF era considerablemente más arenoso que aquel del robledal maduro (HAF), siendo por el contrario el contenido en arcilla significativamente superior en HAF y BRF respecto a XZF (test HSD de Tukey, p-valores < 0.048). De forma similar, el porcentaje de agua disponible del suelo de HAF resultó superior al determinado en XZF (test HSD de Tukey, p-valor < 0.020). El pH fue ligeramente ácido en el sitio BRF y próximo a la neutralidad especialmente aquel correspondiente al suelo del robledal maduro; en efecto, el pH (medido en KCl) de ambos sitios mostró diferencias significativas (test HSD de Tukey, p-valor = 0.029). A su vez, el suelo de ambos sitios resultó significativamente diferente en términos de materia orgánica, siendo el valor registrado para HAF aproximadamente dos veces mayor al correspondiente a BRF (test HSD de Tukey, p-valor = 0.037). Si bien el contenido en carbonatos también fue diferente estadísticamente en ambos sitios, otros parámetros fisicoquímicos como el porcentaje de nitrógeno total o la cantidad de algunos nutrientes como el fósforo o el potasio no resultaron diferentes en ninguno de los casos (Tabla II.1).

¹⁷ Los taxones fantasma o *phantom taxa* son aquellos para los cuales únicamente se detectan las secuencias derivadas del rRNA pero no las correspondientes al rDNA en estudios de *metabarcoding* (Klein *et al.*, 2016). Varios factores pueden contribuir a la explicación de este fenómeno, entre los que se encuentran aspectos técnicos como la introducción de nucleótidos erróneos durante el proceso de retrotranscripción del rRNA. Un insuficiente esfuerzo de muestreo puede conllevar la no detección de secuencias de rDNA de individuos que se encuentran metabólicamente activos, dando lugar a la generación de *phantom taxa*. Taxones muy poco abundantes pero desproporcionadamente activos también contribuyen a este fenómeno (Klein *et al.*, 2016). Así pues, es difícil *a priori* distinguir entre *phantom taxa* debidos a factores biológicos y aquellos surgidos por posibles artefactos metodológicos.

Resultados

Tabla II.1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos bajo la influencia de las raíces de *Q. pyrenaica* correspondientes a las áreas HAF, BRF y XZF. Para cada parámetro se especifica el valor promedio de las tres réplicas (correspondientes a cada subárea) \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre sitios (test ANOVA seguido de contraste *post-hoc* HSD de Tukey; test Kruskal-Wallis; a un nivel de confianza del 95% en ambos casos).

Parámetro	HAF	BRF	XZF
Tipo de suelo	Franco	Franco-arenoso	Franco-arenoso
Arena (%)	39.55 \pm 4.52 a	56.52 \pm 0.98 b	59.12 \pm 3.45 b
Limo (%)	47.88 \pm 3.57 a	31.90 \pm 0.75 a	32.58 \pm 1.68 a
Arcilla (%)	12.57 \pm 1.00 b	11.58 \pm 0.77 b	8.30 \pm 1.85 a
Agua disponible (%)	17.16 \pm 0.83 a	15.75 \pm 2.28 ab	11.57 \pm 1.88 b
pH (H₂O)	6.76 \pm 0.06 a	5.97 \pm 0.15 a	6.23 \pm 0.42 a
pH (KCl)	6.17 \pm 0.06 a	5.27 \pm 0.06 b	5.60 \pm 0.36 b
MOS^a (%)	5.99 \pm 1.88 a	2.72 \pm 0.45 b	3.49 \pm 0.78 ab
N total (%)	0.30 \pm 0.05 a	0.17 \pm 0.03 a	0.25 \pm 0.12 a
Ratio C:N	11.20 \pm 1.91 a	9.36 \pm 0.37 a	8.85 \pm 2.58 a
Carbonatos (%)	3.03 \pm 0.25 a	1.47 \pm 0.42 b	2.80 \pm 0.20 a
Salinidad (mS/cm)	0.13 \pm 0.02 a	0.09 \pm 0.02 ab	0.08 \pm 0.01 b
P asimilable (mg/kg)	20.33 \pm 11.59 a	33.67 \pm 8.02 a	13.00 \pm 17.32 a
K asimilable (mg/kg)	433.3 \pm 5.77 a	160.0 \pm 3.46 a	166.67 \pm 45.09 a

^a MOS, Materia Orgánica del Suelo

II.3.2. Características generales de los datos de pirosecuenciación y diversidad alfa (α)

Tras la secuenciación masiva de las regiones hipervariables V3-V4-V5 del gen *rrs*, un total de 147,453 y 132,096 lecturas brutas fueron obtenidas para el conjunto de librerías de DNA y RNA, respectivamente. El procesado de las mismas conllevó la obtención de 109,236 secuencias de calidad en el caso de las muestras basadas en rDNA y 76,310 para aquellas derivadas de rRNA. El número de secuencias brutas y limpias obtenidas para cada una de las muestras analizadas se recoge en la Tabla II.2.

Las curvas de rarefacción generadas a nivel de OTU (3% de distancia genética) tendieron hacia niveles asintóticos, si bien en ningún caso se alcanzó el *plateau* para el esfuerzo de muestreo realizado (Figura II.2). A su vez, los valores promedio de la cobertura de Good resultaron elevados en todos los casos, encontrándose comprendidos entre el 89.91 y 95.20%, valores correspondientes a las muestras de HAF (librerías de DNA y RNA, respectivamente).

Capítulo II

Tabla II.2. Resumen de los parámetros de calidad de la pirosecuenciación e índices de diversidad α calculados para las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*, tanto para las librerías de DNA como de RNA. Todos los valores fueron computados a un nivel de distancia genética del 3%, y los índices de diversidad α tras realizar la rarefacción de las muestras a 2505 secuencias. En el caso de los índices de diversidad α se especifican los valores promedio obtenidos para las tres subáreas \pm desviación estándar. Diferentes letras latinas indican diferencias significativas entre los sitios muestreados (test ANOVA seguido de contraste *post-hoc* HSD de Tukey), mientras que diferentes letras griegas denotan diferencias significativas entre las librerías de DNA y RNA, en cada sitio (test t de Student). El nivel de confianza considerado para todos los test fue del 95%.

Subárea	Librerías DNA									Librerías RNA								
	HAF			BRF			XZF			HAF			BRF			XZF		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nº secuencias brutas	17,702	25,545	22,273	7500	13,502	15,495	13,025	19,186	13,225	17,609	14,546	4668	17,021	10,140	19,032	19,561	11,927	17,592
Nº secuencias de calidad	13,593	18,697	17,731	5180	9701	11,553	9069	13,952	9760	10,583	8586	2505	10,253	5823	11,112	8770	7290	11,388
Cobertura de Good (%)	94.69	95.53	95.36	88.80	93.13	94.12	92.66	94.70	94.56	93.75	92.52	83.15	93.03	91.69	94.11	91.90	92.09	94.58
Índices de diversidad α (rarefacción a 2505 secuencias)																		
Subárea	HAF			BRF			XZF			HAF			BRF			XZF		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nº OTUs observados	877	937	888	833	818	849	861	902	787	793	841	785	1002	781	846	961	806	813
Chao-1	1874.64 \pm 91.52 aα			1628.24 \pm 39.80 aα			1683.57 \pm 237.76 aα			1579.42 \pm 168.49 aα			1689.60 \pm 323.85 aα			1676.32 \pm 292.21 aα		
Shannon (H')	6.05 \pm 0.04 aα			5.96 \pm 0.01 aα			5.94 \pm 0.11 aα			5.82 \pm 0.11 aβ			6.09 \pm 0.20 aα			6.02 \pm 0.13 aα		
Inv. Simpson (1/D)^a	173.92 \pm 15.82 aα			171.69 \pm 11.34 aα			159.00 \pm 29.18 aα			117.26 \pm 18.37 bβ			230.06 \pm 55.25 aα			182.12 \pm 14.74 abα		
Pielou (J')^b	0.8912 \pm 0.0041 aα			0.8859 \pm 0.0016 aα			0.8816 \pm 0.0108 aα			0.8765 \pm 0.0144 aα			0.9005 \pm 0.0138 aα			0.8940 \pm 0.0640 aα		

^a Inv., Inverso

^b Los valores promedio y desviación estándar del índice de Pielou se especifican con más cifras decimales que el resto de índices para facilitar la interpretación de los datos

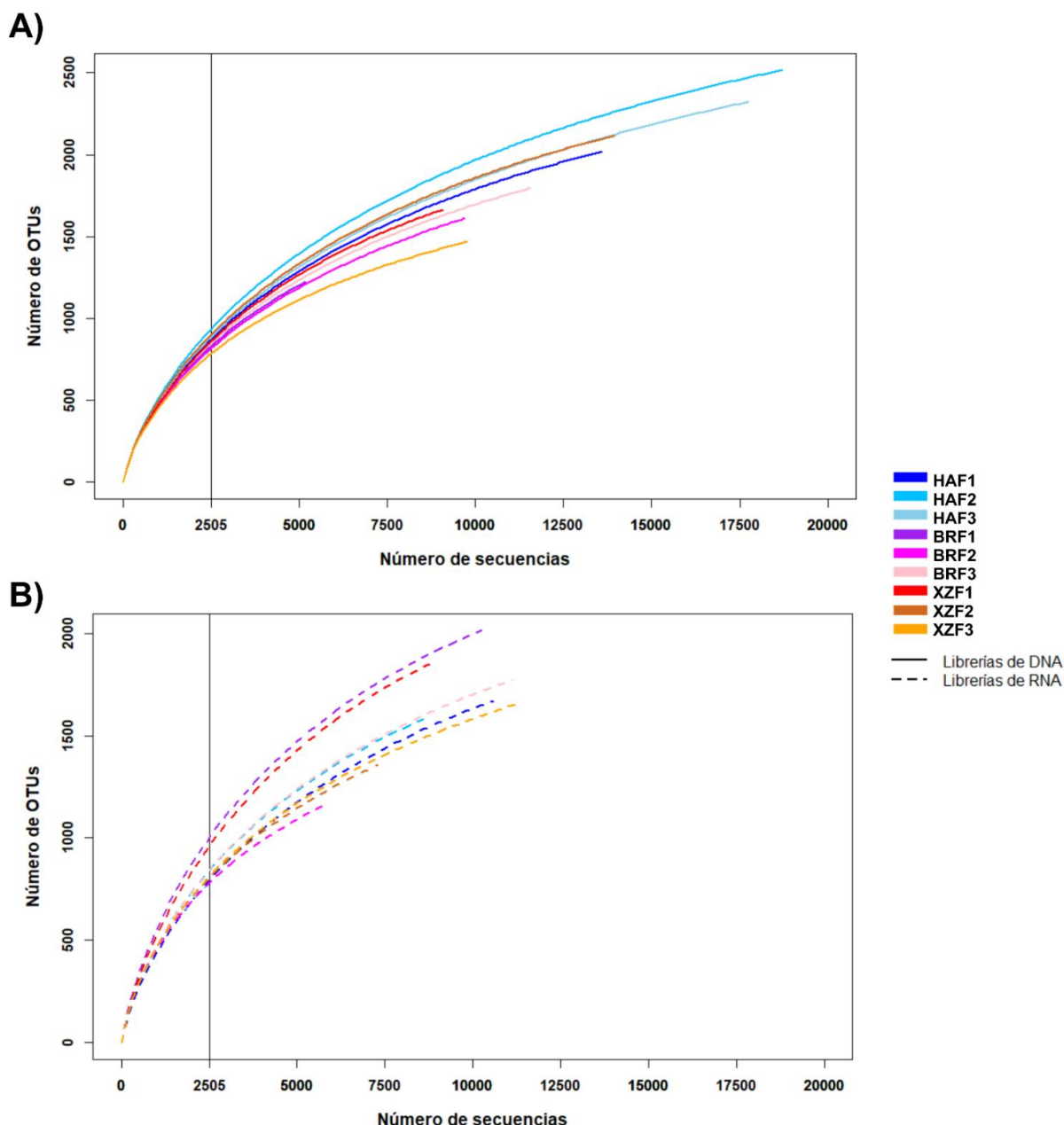


Figura II.2. Curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (3% distancia genética), para las muestras basadas en DNA (A) y en RNA (B). La línea vertical ($x = 2505$ secuencias) indica el tamaño muestral más pequeño del conjunto total de muestras, el cual fue seleccionado para realizar la rarefacción de las muestras y calcular los índices de diversidad α .

Los índices de diversidad α fueron calculados realizando un submuestreo aleatorio al tamaño muestral más pequeño, siendo este de 2505 secuencias, registrado para la réplica 3 del sitio HAF (librería de RNA). Tal y como se muestra en la Tabla II.2, no se detectaron diferencias significativas en términos de riqueza (Chao-1), ni entre las diferentes librerías, ni entre los sitios analizados en cada caso. Ciertas diferencias significativas fueron detectadas al comparar los índices de diversidad α correspondientes a los tres sitios analizados en base a la librería de RNA. Concretamente, el Inverso de Simpson de la comunidad que habita el sitio HAF fue

significativamente inferior respecto a la correspondiente del sitio BRF (test HSD de Tukey, p-valores < 0.020).

Por el contrario, la diversidad de las comunidades procariotas totales (librería de DNA) y potencialmente activas (librería de RNA) resultó elevada y similar en todos los sitios muestreados. Cabe destacar que tan solo para el robledal maduro ubicado en HAF se obtuvieron valores significativamente superiores en la librería de DNA respecto a aquella de RNA para los índices de Shannon e Inverso de Simpson (test de Mann-Whitney U, p-valores < 0.023).

II.3.3. Diversidad beta (β) de las comunidades procariotas

El análisis de la diversidad β fue realizado considerando el conjunto total de datos. Inicialmente se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales en base a la distancia Weighted UniFrac, el cual demostró la relativa multidimensionalidad de los datos ya que aproximadamente el 81% de la varianza se encontraba explicada por hasta cuatro dimensiones. Tal y como se puede observar en la Figura II.3, con dos ejes fue posible explicar una considerable proporción de la varianza existente en los datos (67.4%). La primera coordenada permitió agrupar las muestras en base al tipo de librería considerada, quedando las muestras relativas a las librerías de DNA agrupadas entre sí pero claramente separadas de aquellas correspondientes a las librerías de RNA. Esta observación fue contrastada mediante análisis PERMANOVA, el cual demostró que las comunidades procariotas totales (librerías de DNA) y potencialmente activas (librerías de RNA) eran diferentes estadísticamente en cuanto a las relaciones evolutivas y la abundancia de los OTUs que las componen ($F_{\text{librería}} = 18.388$, $R^2_{\text{librería}} = 0.443$, $p\text{-valor}_{\text{librería}} = 0.001$).

Resultados

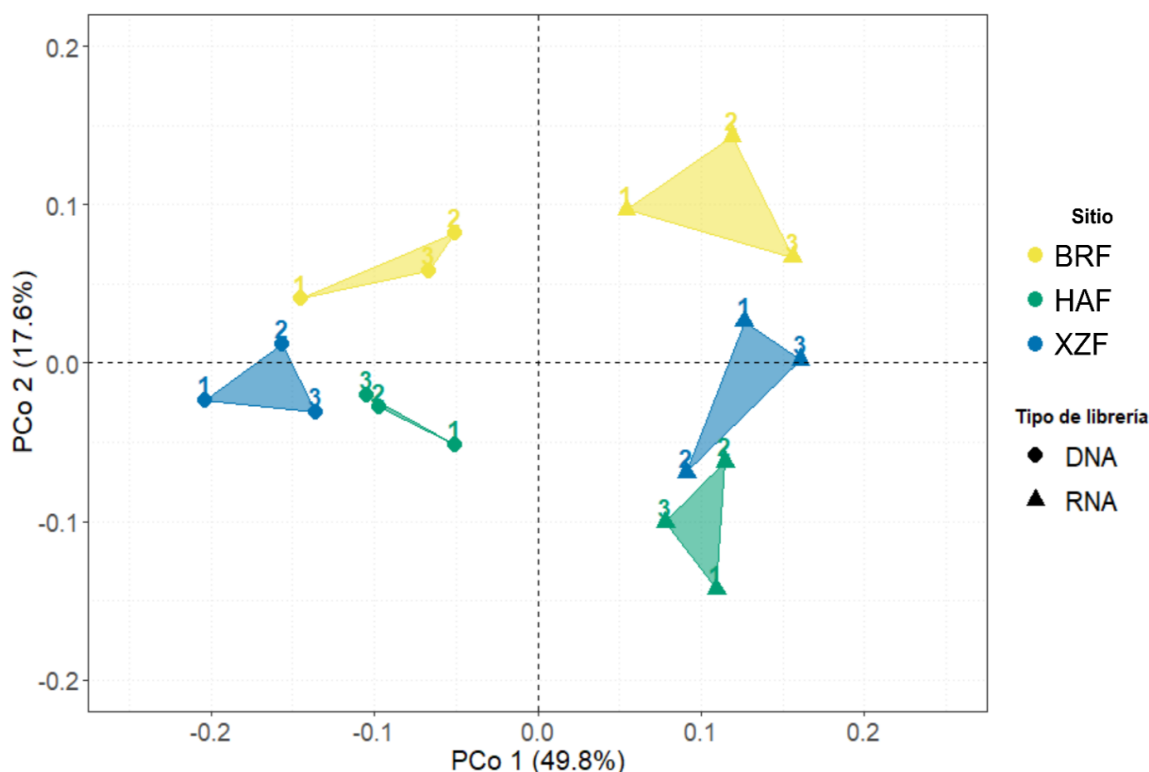


Figura II.3. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de *Q. pyrenaica*. El PCoA fue realizado a nivel de OTU (3% de distancia genética) y en base a la medida de distancia Weighted UniFrac. Los valores incluidos entre paréntesis indican el porcentaje de la varianza observada explicada por cada uno de los correspondientes ejes. Los números localizados encima de cada círculo o triángulo coloreado indican la subárea a la que corresponde cada muestra.

Atendiendo al PCoA (Figura II.3) también se pudo apreciar que las muestras se encontraban distribuidas a lo largo del segundo eje, siendo las comunidades procariotas de HAF y BRF las más distantes en base a ambas librerías. El análisis PERMANOVA reveló que aunque el sitio de muestreo tenía relevancia estadística en la distribución de las muestras, la contribución de este factor era moderada ($F_{\text{Sitio}} = 3.940$, $R^2_{\text{Sitio}} = 0.190$, $p\text{-valor}_{\text{Sitio}} = 0.002$). A su vez, cabe destacar la mayor diversidad β de las muestras correspondientes a las librerías de RNA (en comparación con las correspondientes al rDNA), reflejada en una mayor separación de las mismas a lo largo de la segunda coordenada del PCoA.

Dada la elevada contribución a la separación de las comunidades procariotas del tipo de ácido nucleico (librería) considerado, las muestras basadas en rDNA y las derivadas de rRNA fueron analizadas separadamente. En este caso, los análisis PERMANOVA revelaron que las comunidades procariotas rizosféricas eran significativamente diferentes en función del sitio analizado, tanto en el caso de las poblaciones totales como de las potencialmente activas ($F_{\text{rDNA}}^{\text{Sitio}} = 2.937$, $R^2_{\text{rDNA}}^{\text{Sitio}} = 0.495$, $p\text{-valor}_{\text{rDNA}}^{\text{Sitio}} = 0.003$; $F_{\text{rRNA}}^{\text{Sitio}} = 2.666$, $R^2_{\text{rRNA}}^{\text{Sitio}} = 0.470$, $p\text{-valor}_{\text{rRNA}}^{\text{Sitio}} = 0.020$). Cabe destacar que la robustez de los test PERMANOVA fue avalada con los resultados del análisis PERMDISP2, con el que fue posible deducir que la dispersión de los grupos de muestras correspondientes a los tres sitios era homogénea en el caso de ambas librerías ($F_{\text{rDNA}}^{\text{Sitio}} = 0.950$, $p\text{-valor}_{\text{rDNA}}^{\text{Sitio}} = 0.467$; $F_{\text{rRNA}}^{\text{Sitio}} = 0.773$, $p\text{-valor}_{\text{rRNA}}^{\text{Sitio}} = 0.486$). De esta forma se demostró que las diferencias observadas entre las muestras consideradas eran debidas

exclusivamente a diferencias reales entre el centroide de los grupos de muestras, y no a diferencias en la betadispersión.

Pese a que los análisis PERMANOVA permitieron observar que las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de los robles localizados en HAF, BRF y XZF son diferentes (tanto las poblaciones totales como las potencialmente activas), no fue posible realizar el análisis PERMANOVA por parejas dada la descrita ineficiencia de esta herramienta para los bajos niveles de replicación (Martínez-Arbizu, comunicación personal). No obstante, atendiendo al gráfico de ordenación PCoA (en concreto, al segundo eje), se pudo observar que las muestras correspondientes a HAF y BRF eran las que se encontraban más alejadas. Ello sugiere que dichas comunidades podrían ser entre las que residieran las diferencias registradas en los análisis PERMANOVA.

II.3.4. Relación entre la estructura de las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo y las propiedades fisicoquímicas del suelo

Con el objetivo de determinar si las propiedades edáficas determinadas son responsables en algún grado de la explicación de la varianza existente entre las diferentes comunidades procariotas, se llevó a cabo un análisis de constricción de tipo CAP por cada una de las librerías en estudio.

Inicialmente se eliminaron del análisis todas aquellas variables ambientales colineales, manteniendo únicamente el contenido en agua disponible, en materia orgánica, en nitrógeno total y en fósforo asimilable, el pH (medido en agua) y la salinidad, siendo los valores VIF inferiores a 5.04.

Mediante el análisis de constricción CAP se pudo observar que en el caso de las muestras basadas en rDNA, entre las dos primeras coordenadas se lograba explicar un 44.2% de la varianza de los datos (Figura II.4A). Las muestras correspondientes a los sitios HAF y XZF se agruparon en su mayoría en el eje 1 positivo, quedando separadas de las relativas a BRF. Sin embargo, según el gráfico de ordenación, la dispersión del grupo formado por las tres réplicas de XZF fue considerable, de tal forma que a lo largo de la segunda coordenada (la cual explicaba casi el mismo porcentaje de varianza que la primera) las muestras de BRF se encontraban entre aquellas de HAF y XZF (Figura II.4A). Cabe destacar que el modelo planteado a partir de las variables no colineales comentadas resultó estadísticamente no significativo (test de permutación similar a ANOVA, $p\text{-valor}_{\text{rDNA}}^{\text{Modelo}} = 0.270$). El mismo test estadístico aplicado a cada una de las variables incluidas en el mismo demostró que la abundancia relativa y las relaciones filogenéticas de los OTUs que componen dichas comunidades procariotas no pueden ser estimadas a partir de las mismas ($p\text{-valores}_{\text{rDNA}}^{\text{Factor}_i} > 0.068$).

En el caso de la librería de RNA, el porcentaje de la varianza explicada por las dos primeras coordenadas se encontraba próximo al 60%, aunque en este caso no pudo apreciarse un patrón de ordenación de las muestras bien definido. Tan solo en el primer eje las muestras correspondientes al robledal maduro (HAF) se encontraban separadas de aquellas relativas al sitio BRF, sin embargo se apreció una elevada dispersión de las réplicas de BRF y XZF a lo largo de la segunda coordenada. En tanto, el pH (medido en agua) y el contenido en materia orgánica del suelo resultaron tener un efecto significativo sobre las comunidades procariotas potencialmente activas (test de permutación similar

Resultados

a ANOVA, p-valor $_{\text{IRNA}}^{\text{pH (H}_2\text{O)}}$ = 0.040; p-valor $_{\text{IRNA}}^{\text{MOS}}$ = 0.048). Así pues, y tal y como se aprecia en la Figura II.4B), el pH y el contenido en materia orgánica se encontraban correlacionados negativamente con la primera coordenada fundamentalmente.

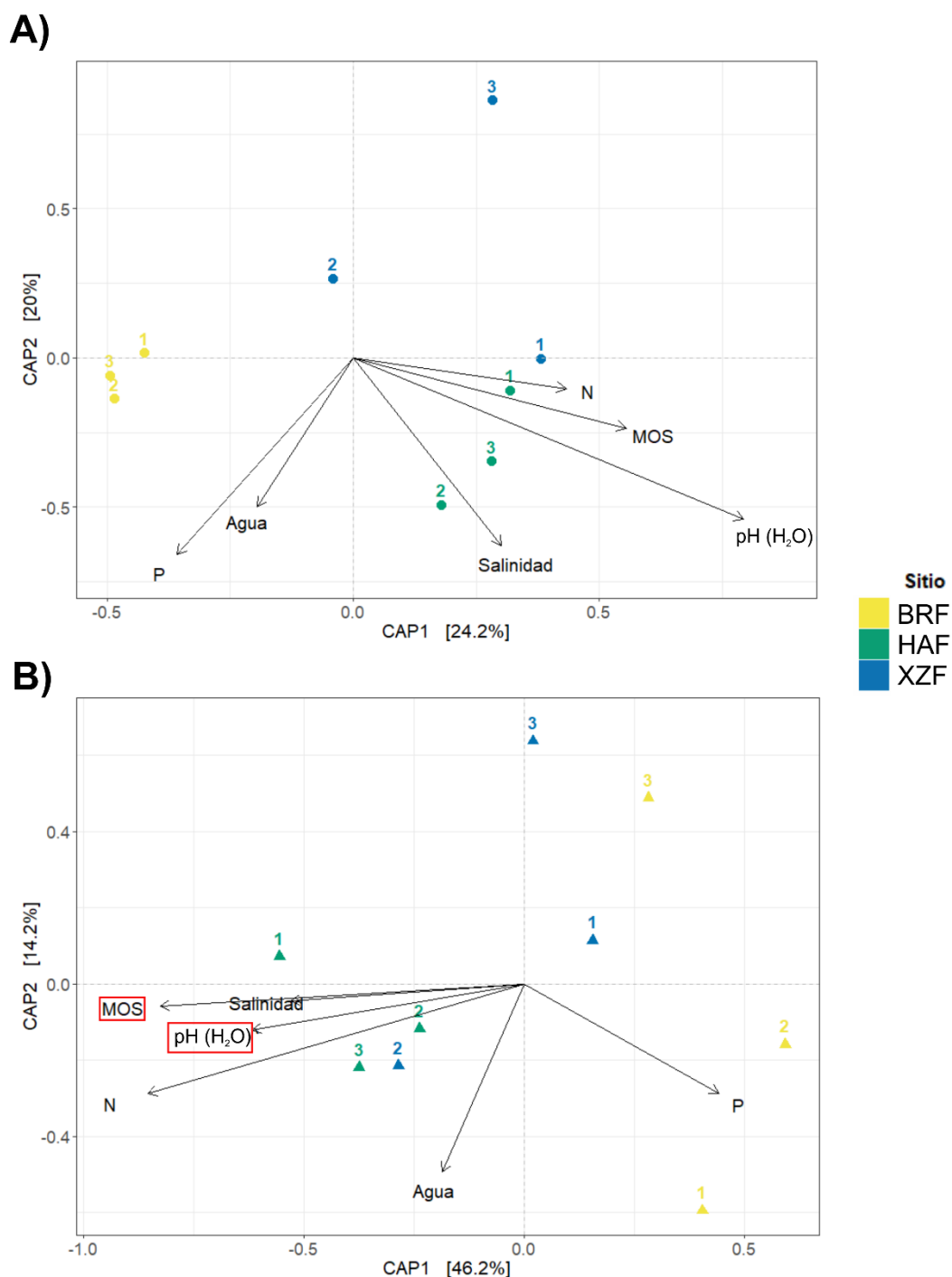


Figura II.4. Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP) de las comunidades procariotas totales (librerías de DNA) (A) y potencialmente activas (librerías de RNA) (B) de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. En ambos casos el análisis fue realizado a nivel de OTU (3% distancia genética) y en base a la medida de distancia Weighted UniFrac, incluyendo en el modelo tan solo las variables de constricción no colineales ($VIF < 10$). Los valores incluidos entre corchetes indican el porcentaje de la varianza observada explicada por cada uno de los correspondientes ejes. Los parámetros fisicoquímicos que se encuentran dentro de un recuadro rojo son aquellos que resultaron estadísticamente significativos según el test de permutación similar a ANOVA, a un nivel de confianza del 95%. Los números localizados encima de cada círculo o triángulo coloreado indican la subárea a la que corresponde cada muestra. El nombre completo de los parámetros fisicoquímicos puede consultarse en la Tabla II.1.

Resultados

II.3.5. Composición de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*

Mediante el análisis del conjunto total de secuencias de calidad, se estudiaron los perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de roble melojo. Teniendo en cuenta tanto las librerías de DNA como aquellas de RNA, se detectaron secuencias correspondientes a 25 *phyla* procarióticos conocidos, siendo la abundancia relativa promedio de diez de ellos superior al 1% en al menos uno de los sitios estudiados (Tabla II.3). Cabe destacar que del total de *phyla* procariotas detectados, dos pertenecían al dominio Archaea (*Euryarchaeota* y *Thaumarchaeota*), si bien el primero no fue ni tan siquiera detectado en las muestras de HAF de las librerías de RNA.

Tabla II.3. Distribución de los *phyla* mayoritarios (> 1%) en al menos uno de los sitios en estudio (HAF, BRF y XZF), considerando las librerías de DNA y RNA. Se especifica el valor de la abundancia relativa promedio de cada *phylum* obtenido para las tres subáreas de cada sitio en estudio (%) \pm desviación estándar. Diferentes letras latinas indican diferencias estadísticamente significativas entre sitios, para cada una de las librerías consideradas (test Kruskal-Wallis seguido de contraste *post-hoc* de Dunn). Letras griegas distintas indican diferencias significativas en la abundancia relativa de los *phyla* entre un tipo de librería y otro (test Mann-Whitney U). El nivel de confianza considerado para todos los test estadísticos fue del 95%.

	Librerías DNA			Librerías RNA		
	HAF	BRF	XZF	HAF	BRF	XZF
<i>Proteobacteria</i>	31.45 \pm 3.08 aα	25.90 \pm 1.99 aα	26.95 \pm 4.37 aα	52.41 \pm 4.26 aβ	37.45 \pm 4.96 bβ	47.73 \pm 5.15 abβ
<i>Acidobacteria</i>	22.86 \pm 2.86 aα	24.81 \pm 1.61 aα	21.51 \pm 3.31 aα	17.07 \pm 3.40 aβ	19.96 \pm 1.20 aβ	15.06 \pm 2.53 aβ
<i>Bacteroidetes</i>	13.03 \pm 1.30 aα	11.81 \pm 5.02 aα	21.35 \pm 1.89 aα	9.67 \pm 1.93 aα	4.94 \pm 2.22 aβ	7.53 \pm 3.78 aβ
<i>Actinobacteria</i>	6.43 \pm 2.35 aα	6.04 \pm 1.82 aα	3.71 \pm 0.80 aα	5.79 \pm 1.02 aα	13.27 \pm 3.57 aβ	10.55 \pm 4.86 aβ
<i>Verrucomicrobia</i>	5.15 \pm 2.83 aα	6.52 \pm 2.53 aα	5.99 \pm 3.16 aα	1.45 \pm 0.21 aβ	1.65 \pm 0.86 aβ	1.70 \pm 1.04 aα
<i>Planctomycetes</i>	3.51 \pm 0.14 aα	2.78 \pm 0.89 aα	3.08 \pm 0.73 aα	2.18 \pm 0.19 aβ	3.20 \pm 0.63 aα	2.77 \pm 0.82 aα
<i>Gemmatimonadetes</i>	3.15 \pm 0.34 aα	4.16 \pm 1.47 aα	3.18 \pm 1.20 aα	0.64 \pm 0.25 aβ	2.35 \pm 0.73 bβ	1.25 \pm 0.58 abα
<i>Candidate division WPS-2</i>	0.55 \pm 0.01 aα	0.68 \pm 0.06 aα	0.42 \pm 0.05 aα	0.69 \pm 0.29 aα	1.20 \pm 0.64 aα	0.88 \pm 0.36 aβ
<i>Chloroflexi</i>	0.62 \pm 0.19 aα	0.98 \pm 0.30 aα	0.71 \pm 0.24 aα	0.58 \pm 0.34 aα	1.27 \pm 1.21 aα	0.45 \pm 0.15 aα
<i>Candidate division WPS-1</i>	0.38 \pm 0.09 aα	0.74 \pm 0.54 aα	0.57 \pm 0.44 aα	0.32 \pm 0.15 aα	1.31 \pm 0.56 aα	0.83 \pm 0.29 aα

Las librerías de DNA se encontraban fundamentalmente representadas por los *phyla* *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*, los cuales supusieron aproximadamente el 80% de las secuencias de DNA registradas en cada uno de los respectivos sitios analizados (Figura II.5B). La distribución de dichos taxones a lo largo de los mismos resultó estable y homogénea. Concretamente, la abundancia relativa de los *phyla* mayoritarios en HAF, BRF y XZF no resultó significativamente diferente (test Kruskal-Wallis, p-valores < 0.061).

Las comunidades procariotas potencialmente activas también se encontraron marcadas por los *phyla* predominantes anteriormente mencionados, sin embargo en este caso la distribución de los mismos varió en función del sitio considerado (Figura II.5B). Así, *Proteobacteria* – *phylum* dominante en los tres sitios en estudio – resultó significativamente más abundante en HAF que en BRF (test Kruskal-Wallis seguido de contraste *post-hoc* de Dunn, p-valor = 0.038), encontrándose por el contrario *Gemmatimonadetes* menos representado en el robledal maduro que en el pinar reforestado, BRF (test Kruskal-Wallis seguido de contraste *post-hoc* de Dunn, p-valor = 0.045; Tabla II.3).

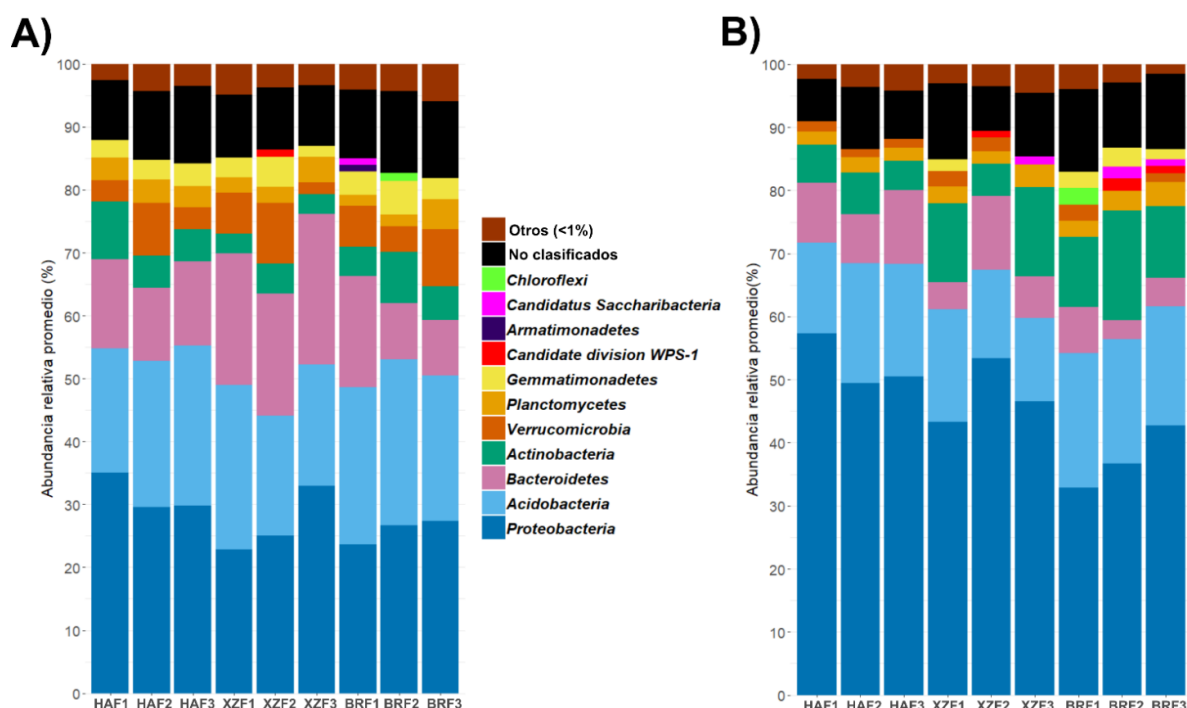


Figura II.5. Abundancia relativa promedio de los *phyla* mayoritarios que habitan la rizosfera de *Q. pyrenaica*, en base a las librerías de DNA (A) y RNA (B). En el grupo artificial *Otros* (< 1%) se incluyen todos aquellos *phyla* representados por menos de un 1% de las secuencias de las librerías correspondientes. *No clasificados* hace referencia a aquellos *phyla* que no pudieron ser identificados con ningún otro presente en la base de datos empleada. Los datos referentes a las diferencias significativas en la abundancia relativa de los *phyla* considerados entre los sitios muestreados y entre librerías se recogen en la Tabla II.3.

Aunque la composición de las comunidades procariotas totales y potencialmente activas resultó muy similar en cuanto a los principales *phyla*, la abundancia relativa de ocho de ellos resultó ser significativamente diferente. Específicamente, el porcentaje de secuencias adscritas al *phylum* *Proteobacteria* en las librerías de DNA osciló entre 25.90 y 31.45%, mientras que dichos registros fueron considerablemente superiores en las librerías de RNA (37.45-52.41%, Tabla II.3). Asimismo, la abundancia relativa promedio de las actinobacterias detectadas en el sitio BRF y en las librerías de RNA fue aproximadamente dos veces superior a la registrada en dicho sitio en relación a las comunidades totales (librerías de DNA). En tanto, en determinados sitios otros *phyla* como *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* y *Gemmatimonadetes* se encontraban significativamente más representados en la librería de DNA que en la correspondiente basada en RNA (ver Tabla II.3 y Figura II.5B).

II.3.6. Descripción del *core*-DNA, *core*-RNA y *core*-compartido procarióticos de la rizosfera de *Q. pyrenaica*

Teniendo en cuenta los parámetros de ubicuidad (presencia de los individuos en todos los sitios en estudio) y persistencia de al menos 55.5% (incidencia de los mismos en al menos cinco de las nueve muestras consideradas), se definió el *core* procarioma rizosférico total (librerías de DNA) y potencialmente activo (librerías de RNA). De los 5718 OTUs totales registrados en la librería de DNA, el 18.7% cumplía con los criterios arriba mencionados (Figura II.6 A, panel izquierdo), suponiendo un 81.1% de las secuencias totales de rDNA (Figura II.6 A, panel derecho). En tanto, los tres sitios de muestreo compartieron 869 de los 5219 OTUs potencialmente activos registrados, de manera que el *core*-RNA se encontraba constituido por aproximadamente el 79% de las secuencias totales derivadas del rRNA rizosférico (Figura II.6B, panel derecho). En la Tabla II.4 se detalla el aporte de OTUs a los respectivos *core* por cada subárea en estudio.

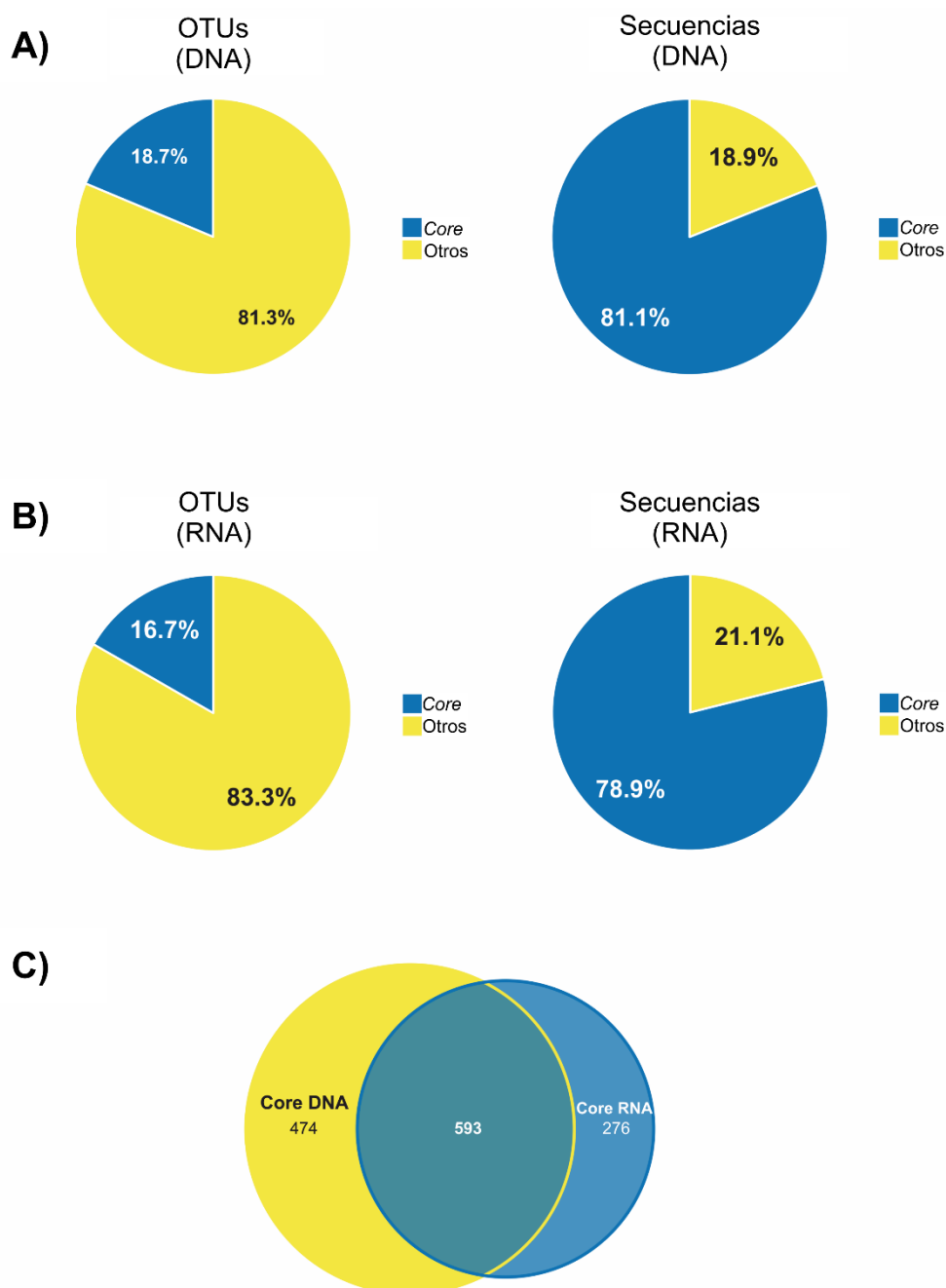


Figura II.6. Porcentaje de OTUs (izquierda) y de secuencias que supusieron los OTUs (derecha) del core-DNA y core-RNA (A y B, respectivamente). C) Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs que componen el core-compartido. Todos aquellos OTUs detectados en los tres sitios en estudio (HAF, BRF, XZF) y en al menos 5 de las 9 muestras fueron considerados como OTUs de los correspondientes *core*. Además, se indica el porcentaje de OTUs que no cumplen dicho criterio, clasificados como *Otros* (A y B), y el número de OTUs específicos de las librerías de DNA y RNA, esto es, *accesorios* (C).

Resultados

Tabla II.4. Distribución del número de OTUs que forman parte del *core*-DNA y/o *core*-RNA por cada subárea y sitio de muestreo.

Sitio	Subárea	Core-DNA	Core-RNA
HAF	1	857	718
	2	934	715
	3	909	488
BRF	1	680	714
	2	859	614
	3	881	744
XZF	1	765	709
	2	897	643
	3	476	741

Con el objeto de estudiar aquellos OTUs que habitan la rizosfera de roble melojo y podrían encontrarse activos, el *core*-DNA y el *core*-RNA fueron comparados entre sí, detectándose 593 OTUs que se encontraban en ambos *core* (Figura II.6C). Para el 44.42% de los OTUs que forman el *core*-DNA no fueron detectadas secuencias derivadas del rRNA en el correspondiente *core*-RNA, mientras que el porcentaje de potenciales *phantom taxa* (OTUs detectados exclusivamente en las librerías de RNA) fue del 31.76%.

Teniendo en cuenta que los OTUs que forman parte del *core*-compartido se corresponden con individuos que están presentes en la rizosfera de diferentes tipos de roble, se pasó a considerar todos los individuos que componen el *core*-DNA y el *core*-RNA como sólo dos comunidades, independientemente de la abundancia relativa de los mismos en cada uno de los sitios en estudio (HAF, BRF, XZF).

Cabe destacar que se pudo apreciar una correspondencia absoluta entre la composición del *core*-DNA y del *core*-RNA a nivel de *phylum* (Figura II.7A y B). Sin embargo, el porcentaje de secuencias de cada *phylum* por el que los *core* se encontraban representados no coincidió completamente.

Conviene señalar que aunque en la rizosfera de algunos de los robles se pudieron detectar OTUs adscritos al dominio Archaea (Apartado II.3.5.), ninguno de los *core* se encontraba formado por OTUs pertenecientes a dicho dominio¹⁸. Mientras el *core*-DNA se hallaba representado fundamentalmente por los *phyla* *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia* (los cuales supusieron un total de 77.93% de las secuencias del *core*-DNA; Figura II.7A), más de la mitad de las secuencias que componían el *core* bacterioma potencialmente activo correspondían al *phylum* *Proteobacteria* (Figura II.7B). En suma, aproximadamente el 80% de las secuencias derivadas del rRNA se hallaban relacionadas con solo tres *phyla*, concretamente el anteriormente mencionado, *Acidobacteria* y *Actinobacteria*.

¹⁸ Dado que no fueron detectadas secuencias correspondientes al dominio Archaea en ninguno de los *core* analizados, de aquí en adelante estos serán considerados como *core* bacterioma.

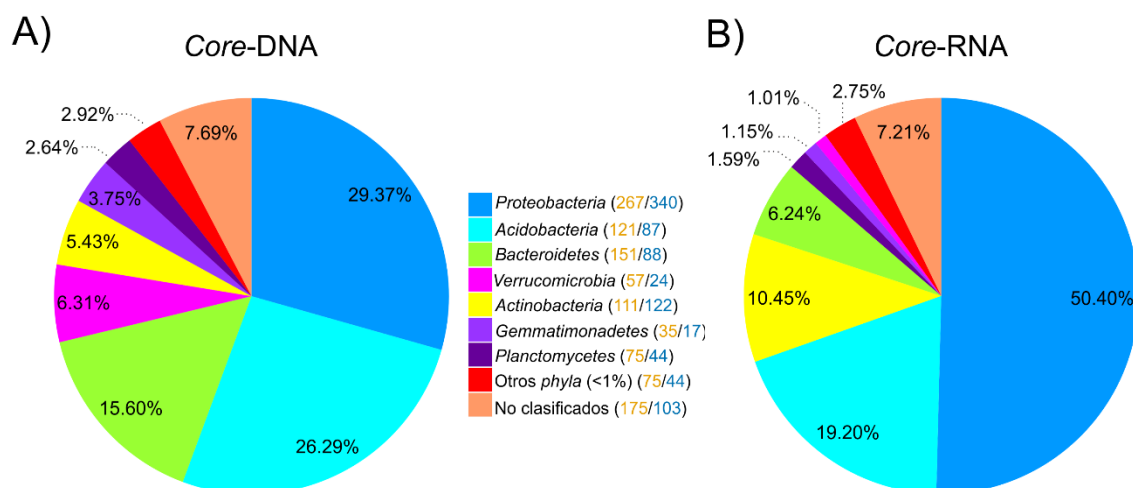


Figura II.7. Composición del core bacterioma total (A) y core bacterioma potencialmente activo (B) a nivel de *phylum*. Los valores expresan porcentualmente la cantidad de secuencias registradas para cada *phylum* con respecto al total de secuencias que componen cada uno de los core. Entre paréntesis se indica en color amarillo y azul el número de OTUs adscritos al correspondiente *phylum* en el core de DNA y RNA, respectivamente. El grupo artificial *Otros phyla* (< 1%) engloba todos aquellos *phyla* que se encuentran representados por menos del 1% del total de secuencias que componen cada core; *No clasificados* incluye a todos aquellos *phyla* que no pudieron ser identificados con ningún otro presente en la base de datos empleada.

La composición de ambos core fue analizada a rangos taxonómicos inferiores. Concretamente, se profundizó en las diferentes clases, órdenes y familias pertenecientes a *Proteobacteria*, por tratarse del *phylum* numéricamente dominante en ambos core bacteriomas. En los dos casos se detectaron las clases *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- y *Gammaproteobacteria*, siendo la primera de ellas la predominante en ambos core. Tal y como se muestra en la Figura II.8A, *Rhizobiales* – orden perteneciente a la clase *Alphaproteobacteria* – resultó el orden más numeroso del core-DNA. Por otro lado, el core bacterioma potencialmente activo se encontraba extensamente representado por el mencionado orden así como por *Caulobacterales* (Figura II.8A), si bien este orden supuso tan solo un 0.66% del total de secuencias del core-DNA. En el caso del core-RNA, dos familias dirigían la clase *Alphaproteobacteria*: *Caulobacteraceae* y una familia no clasificada adscrita al orden *Rhizobiales*. Estas se encontraron representadas, respectivamente, por más de un 6 y 5% del total de secuencias del mencionado core. Destaca también la semejante representación de la familia *Bradyrhizobiaceae* en ambos core bacteriomas (Tabla II.5).

Resultados

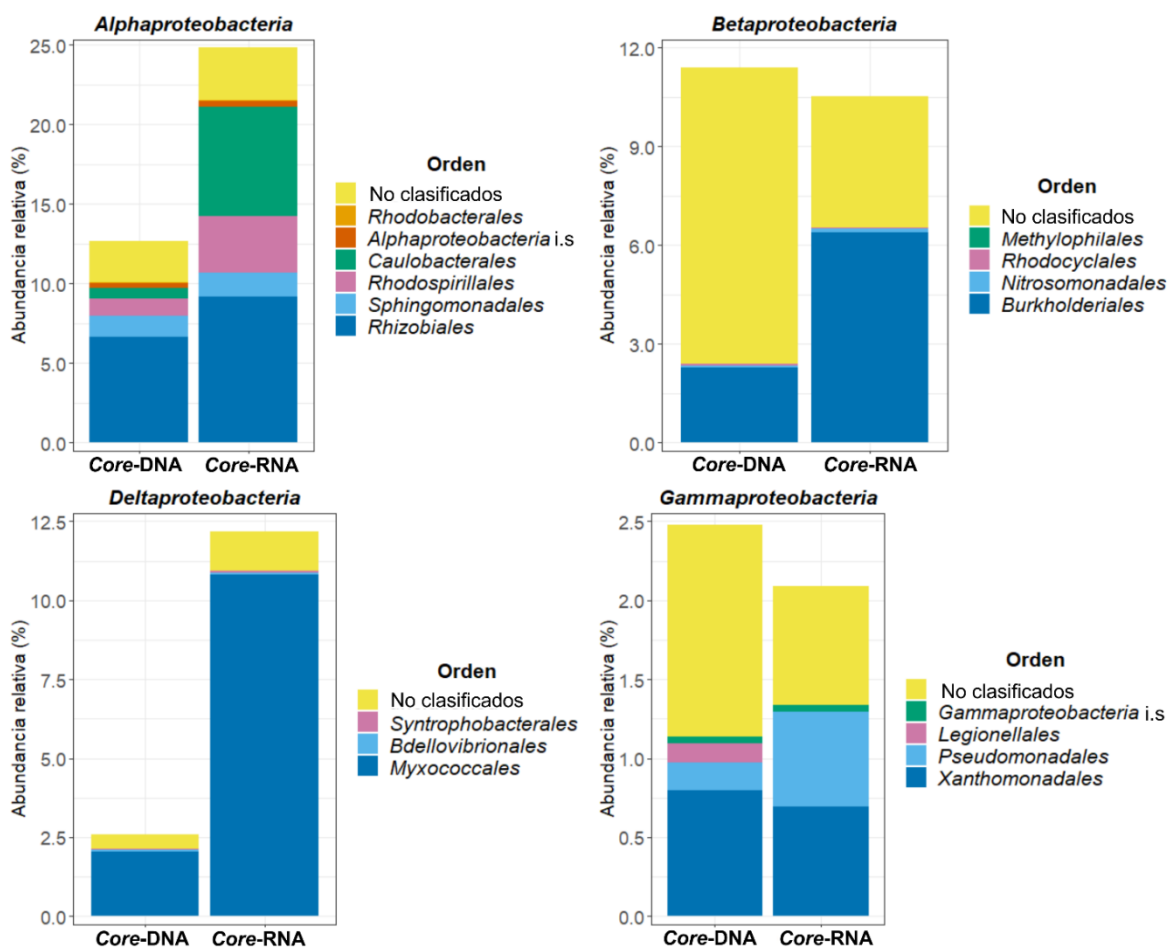


Figura II.8. Abundancia relativa, expresada porcentualmente, de los órdenes detectados pertenecientes al phylum *Proteobacteria* en el core-DNA y core-RNA. Se representan las clases *Alphaproteobacteria* (A), *Betaproteobacteria* (B), *Deltaproteobacteria* (C) y *Gammaproteobacteria* (D). No clasificados hace referencia a aquellos órdenes que no pudieron ser identificados con ningún otro presente en la base de datos empleada. i. s., *incertae sedis*.

En el caso de las clases *Beta-* y *Deltaproteobacteria*, la predominancia de ciertos órdenes en los dos tipos de core estudiados fue notoria. Cabe destacar que, en el core bacterioma total (DNA), la mayoría de las secuencias detectadas de la clase *Betaproteobacteria* no se encontraban identificadas con ningún orden descrito hasta la fecha del procesamiento de datos. Fue por tanto *Burkholderiales* el orden conocido para el cual se detectó un mayor porcentaje de secuencias, tanto a nivel de rDNA como de aquellas derivadas del rRNA (2.29 y 6.40%, respectivamente). Sin embargo, es de remarcar la considerable representación en el core-RNA de familias que no pudieron ser identificadas con ninguna otra conocida a pesar de encontrarse clasificadas en dicho orden (60.31% de las secuencias correspondientes al orden *Burkholderiales*, Tabla II.5).

Como se muestra en la Figura II.8C, relativa a la clase *Deltaproteobacteria*, la dominancia del orden *Myxococcales* fue considerable, tanto en el core bacterioma total como en el potencialmente activo. En efecto, el 79.77% de las secuencias correspondientes a *Deltaproteobacteria* fueron asignadas a dicho orden (a nivel de rDNA), 87.45% en el caso del core-RNA. Destaca el alto porcentaje de secuencias derivadas del rRNA que no pudieron ser adscritas a ninguna familia conocida de este orden (Tabla II.5).

Por otro lado, en el caso de la clase *Gammaproteobacteria* pudo observarse un patrón muy similar al obtenido para *Betaproteobacteria*, registrándose una considerable proporción de secuencias no clasificadas a nivel de orden, en sendos core-bacteriomas (Figura II.8D). Entre los órdenes identificados, *Xanthomonadales* supuso el 33.17 y 33.23% de las secuencias totales de rDNA y derivadas del rRNA, respectivamente. Sin embargo, en el core-RNA, la representación del mencionado orden resultó muy similar a la de *Pseudomonadales* (28.62% de las secuencias registradas para la clase *Gammaproteobacteria*). Tal y como se detalla en la Tabla II.5, el orden *Pseudomonadales* se encontraba dirigido exclusivamente por la familia *Pseudomonadaceae*.

Tabla II.5. Distribución de las familias adscritas a los diferentes órdenes y clases del phylum *Proteobacteria*, en el core-DNA y core-RNA rizosférico de *Q. pyrenaica*. Los valores hacen referencia a la cantidad de secuencias detectadas de cada familia respecto al total de secuencias que componen cada uno de los core, y estos se encuentran expresados porcentualmente (%).

Clase	Orden ^a	Familia ^{a,b}	Core-DNA	Core-RNA
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	2.47	2.17
		<i>Hyphomicrobiaceae</i>	0.34	0.82
		<i>Phyllobacteriaceae</i>	0.31	0.36
		<i>Rhizobiaceae</i>	0.12	0.13
		<i>Rhizobiales</i> i.s	0.07	0.33
		<i>Xanthobacteraceae</i>	0.04	0.07
		<i>Methylocystaceae</i>	0.02	0.00
		<i>Methylobacteriaceae</i>	0.01	0.11
		<i>Beijerinckiaceae</i>	0.00	0.03
		No clasificadas	3.26	5.17
	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	1.24	1.41
		<i>Erythrobacteraceae</i>	0.08	0.08
		No clasificadas	0.00	0.00
	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	0.40	0.87
		<i>Acetobacteraceae</i>	0.21	1.03
		No clasificadas	0.47	1.66
	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	0.61	6.68
		<i>Hyphomonadaceae</i>	0.05	0.20
		No clasificadas	0.00	0.00
	<i>Alphaproteobacteria</i> i.s	<i>Micropepsaceae</i> ^c	0.32	0.37
		No clasificadas	0.00	0.00
	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	0.08	0.03
		No clasificadas	0.00	0.00
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	0.76	1.98
		<i>Oxalobacteraceae</i>	0.48	0.36
		<i>Burkholderiaceae</i>	0.16	0.20
		No clasificadas	0.88	3.86
	<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	0.06	0.10
		No clasificadas	0.00	0.00
	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	0.04	0.05
		No clasificadas	0.00	0.00
	<i>Methylophilales</i>	<i>Methylophilaceae</i>	0.01	0.00
		No clasificadas	0.00	0.00

Resultados

Clase	Orden ^a	Familia ^{a,b}	Core-DNA	Core-RNA	
Deltaproteobacteria	<i>Myxococcales</i>	<i>Polyangiaceae</i>	0.27	1.89	
		<i>Cystobacteraceae</i>	0.26	1.33	
		<i>Nannocystaceae</i>	0.00	0.05	
		<i>Haliangiaceae</i>	0.00	0.03	
		No clasificadas	1.53	7.50	
	<i>Bdellovibrionales</i>	<i>Bdellovibrionaceae</i>	0.06	0.08	
		No clasificadas	0.00	0.00	
	<i>Syntrophobacterales</i>	No clasificadas	0.03	0.04	
	Gammaproteobacteria	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	0.40	0.39
			<i>Sinobacteraceae</i>	0.31	0.24
No clasificadas			0.09	0.06	
<i>Pseudomonadales</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	0.18	0.60	
		No clasificadas	0.00	0.00	
<i>Legionellales</i>		<i>Coxiellaceae</i>	0.06	0.00	
		<i>Legionellaceae</i>	0.06	0.00	
		No clasificadas	0.00	0.00	
<i>Gammaproteobacteria</i> i.s		<i>Thiopfundaceae</i> ^c	0.03	0.03	
		<i>Solimonadaceae</i> ^c	0.02	0.01	
	No clasificadas	0.00	0.00		

^a i.s, *incertae sedis*.

^b No clasificadas, familias que no fueron identificadas con ninguna otra conocida.

^c Familias clasificadas según LPSN (Euzéby, 1997).

II.3.7. Identificación de taxones del core-compartido de la rizosfera de *Q. pyrenaica* con actividad potencial

Tal y como se muestra en la Figura II.6C, 593 OTUs fueron detectados en ambos core-bacteriomas, formando por tanto parte del core-compartido y siendo por ende candidatos a encontrarse metabólicamente activos en la rizosfera de roble melojo en el momento de muestreo. Tomando los 593 OTUs en conjunto, la abundancia relativa de los mismos determinada en base a las secuencias de rDNA se encontraba significativamente correlacionada con aquella abundancia calculada en base a las secuencias derivadas del rRNA (test de correlación de Spearman, $p = 0.544$, $p\text{-valor} = 2.2 \cdot 10^{-6}$; test de correlación de Kendall, $\tau = 0.380$, $p\text{-valor} = 2.2 \cdot 10^{-6}$).

Aunque la correlación detectada fue moderadamente positiva, en la Figura II.9 se puede apreciar que el porcentaje de secuencias de rDNA detectado para algunos OTUs se encontraba fuertemente alejado del correspondiente porcentaje calculado en base a las secuencias derivadas del rRNA.

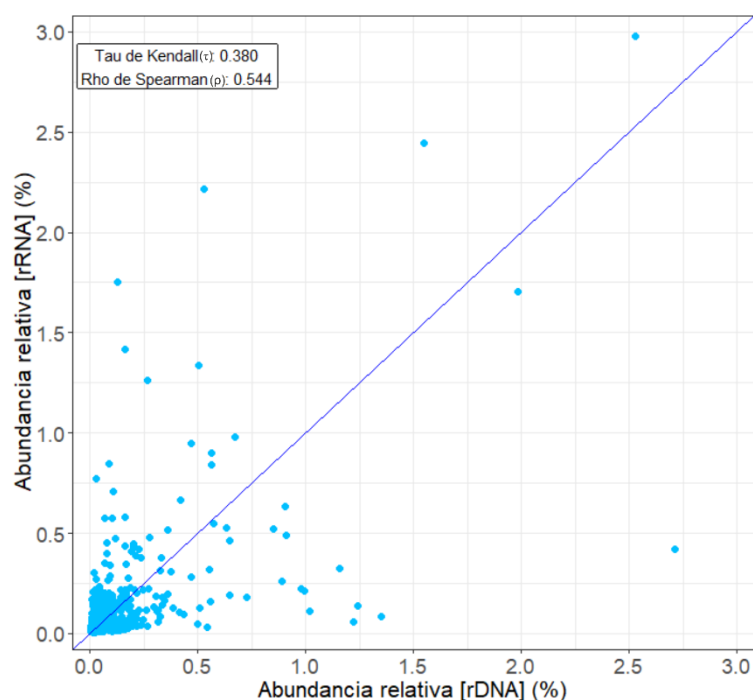
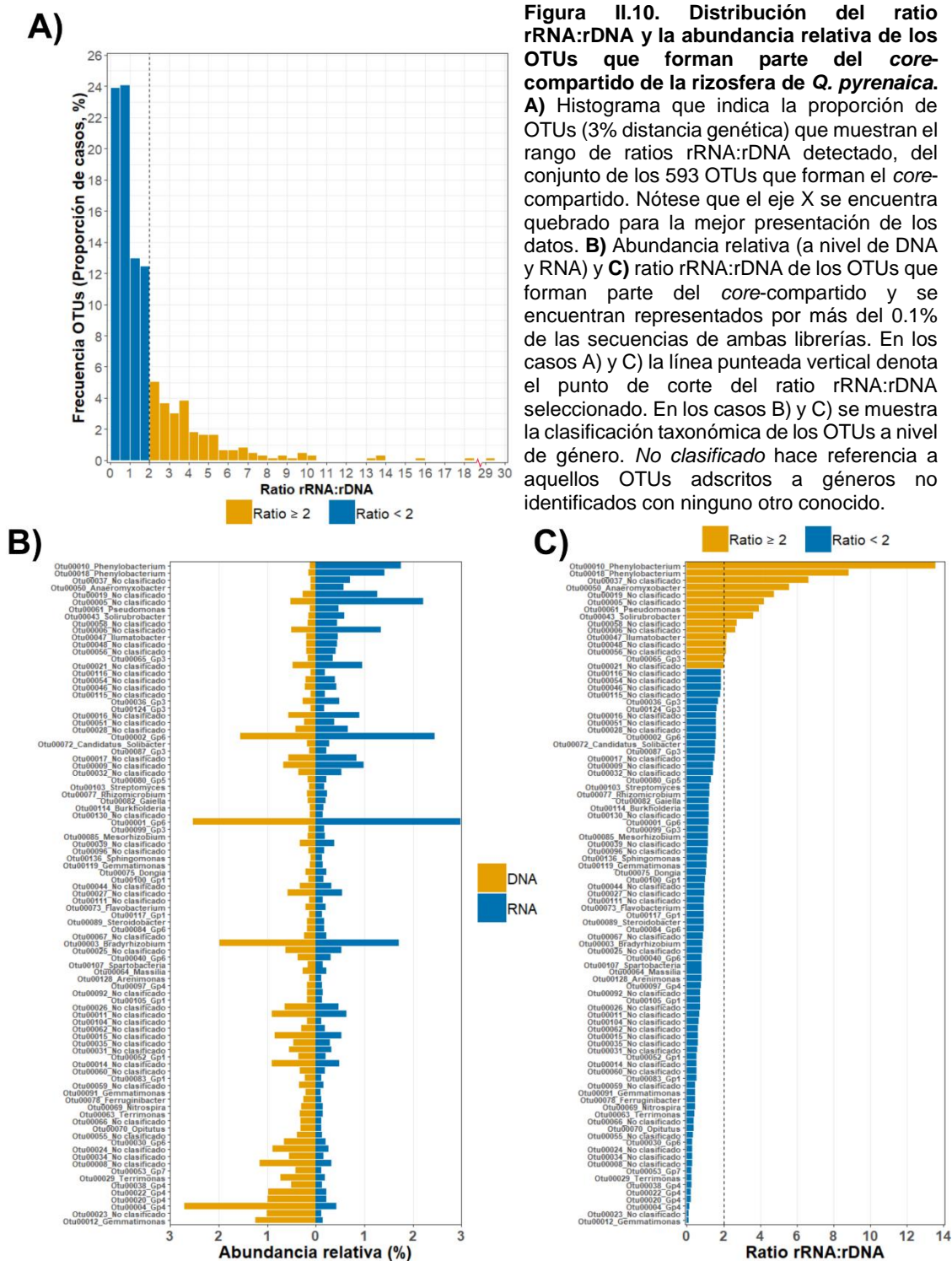


Figura II.9. Relación existente entre la abundancia relativa de cada uno de los 593 OTUs del core-compartido determinada en base a las secuencias de rDNA y aquella determinada en base a las secuencias derivadas del rRNA. La recta azul de ecuación $y = x$ representa la recta que hipotéticamente se obtendría en caso de detectarse una correlación absoluta entre ambas variables, para los 593 OTUs del core-compartido.

Ante la cierta desproporción apreciada entre la abundancia relativa calculada en base a ambos tipos de ácidos nucleicos, se computó el ratio rRNA:rDNA para cada uno de los OTUs del core-compartido. Los valores de dicha proporción se encontraban comprendidos en un rango considerablemente amplio, siendo el mínimo y máximo de 0.046 y próximo a 29, respectivamente (Figura II.10A). Aproximadamente 73.5% de los OTUs compartidos poseían un ratio rRNA:rDNA asociado inferior a 2 (Figura II.10A), siendo la abundancia relativa de los mismos (librería de DNA) considerablemente baja en la mayoría de los casos. Tal es así que tan solo 15 de los 157 OTUs para los cuales se registró un ratio superior o igual a 2, fueron representados por más de un 0.1% de las secuencias de dicha librería (Figura II.10B).

En cuanto a la adscripción taxonómica de los 157 OTUs con mayor valor de dicho ratio (≥ 2), cabe destacar que 64.33% de los mismos no pudieron ser identificados con ningún género conocido. Tal es así que 79 de los 157 OTUs en consideración no se encontraban clasificados ni tan siquiera a nivel de familia. De todos ellos, 24 pertenecieron al orden *Myxococcales*.

Nueve de los 157 OTUs cuyo valor del ratio rRNA:rDNA era superior o igual a 2 se encontraban adscritos a la familia *Caulobacteraceae*, perteneciendo a su vez cuatro de ellos al género *Phenylobacterium*. Destacan los OTUs 00010 y 00018 pertenecientes al mencionado género por el elevado ratio rRNA:rDNA asociado (13.56 y 8.83, respectivamente) y su abundancia relativa superior al 1% tanto en la librería de RNA como de DNA (Figura II.10B y C).



II.4. Discusión

Ante el evidente estado de degradación de las masas de *Q. pyrenaica* y la reducción de su área de distribución, en este trabajo se pretendió desarrollar una aproximación basada en el análisis del procarioma rizosférico de esta especie como primer paso hacia la búsqueda de inoculantes bacterianos con los que llevar a cabo tareas de repoblación. Para ello, se estudió la estructura y composición de las

comunidades que habitan la rizosfera de robles de diferente edad y que constituyen diferentes tipos de formaciones forestales (bosque cerrado formado por individuos longevos, HAF; pinar quemado en 1995 y subsecuentemente repoblado con plantones de roble melojo, BRF; pies sueltos de *Q. pyrenaica* desarrollados tras el abandono en 1965 de una plantación de sorgo, XZF). La diversidad taxonómica y funcional de la comunidad procariota de la rizosfera de individuos de esta especie localizados en los sitios HAF y XZF ha sido estudiada previamente mediante una aproximación metagenómica (Cobo-Díaz *et al.*, 2017). Sin embargo, dichos autores realizaron sus observaciones en base a una secuenciación *shotgun* de DNA, analizando los perfiles taxonómicos de las comunidades a niveles de profundidad menores (*phylum*) y estudiando determinadas rutas metabólicas. Así pues, los análisis realizados en este trabajo en base tanto al DNA como al RNA procariótico suponen una complementación a los resultados obtenidos por Cobo-Díaz y colaboradores (2017), y un paso adicional hacia el estudio de la microbiota de esta especie leñosa.

El suelo rizosférico de los tres sitios analizados resultó diferente en cuanto a algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Las diferencias observadas en el contenido en arena y arcilla podrían ser la causa que explicase la diferente proporción de agua disponible en los suelos en estudio. De forma general, en el suelo las partículas texturales de mayor tamaño son aquellas de arena, siendo las de arcilla las de inferior tamaño. Así, el espacio poroso de un suelo rico en arcilla es mayor que el correspondiente al de un suelo predominantemente arenoso, por lo que aquellos arcillosos se caracterizan por tener mayor capacidad de retener el agua y por la peor capacidad de drenaje que los arenosos (FAO, 2019). Por tanto, el menor contenido en arena pero mayor proporción de arcilla del suelo de HAF con respecto al de XZF podría justificar la mayor cantidad de agua disponible del suelo del robledal maduro. Sin embargo, esta hipótesis es difícil de verificar considerando el suelo de BRF. Este no mostró un contenido en agua disponible significativamente diferente respecto al suelo de ninguno de los otros dos sitios sino una cantidad intermedia entre ambos, pero sí un porcentaje similar de arcilla y arena con respecto a HAF y XZF, respectivamente. Por otro lado, el pH edáfico de los sitios en estudio se encontraba próximo a la neutralidad o era ligeramente ácido, tal y como era de esperar dada la frecuencia con la que esta especie forestal se desarrolla en suelos silicícolas y sustratos ácidos. En efecto, Cobo-Díaz y colaboradores (2017) ya registraron previamente valores muy similares de pH del suelo de las zonas HAF y XZF. Dichos hallazgos se encuentran en línea con las propiedades generales de los suelos forestales, los cuales tienden a ser ricos en compuestos polifenólicos que caracterizan la hojarasca depositada, y que conducen a cierta acidificación de los mismos (Li *et al.*, 2014).

Aunque los suelos de los sitios en estudio resultaron diferentes entre sí en cuanto a varios parámetros fisicoquímicos, el contenido en materia orgánica fue uno de los que mostró diferencias en mayor magnitud, si bien todos los suelos resultaron pobres en materia orgánica. El suelo obtenido del robledal maduro (HAF) era considerablemente más rico en materia orgánica que aquel de BRF, zona quemada durante un incendio y posteriormente reforestada con pies de roble melojo. Otros autores han demostrado en estudios anteriores que los incendios forestales pueden conducir a niveles más bajos de materia orgánica en comparación con suelos no afectados por el fuego (Cobo-Díaz *et al.*, 2015). Sin embargo, BRF y XZF (zonas sin signos de haber sido afectadas por un

Resultados

incendio) no resultaron diferentes en cuanto a dicha propiedad edáfica. Atendiendo a la historia y características forestales de los sitios en estudio (Apartado M.1.), inicialmente cabría esperar que la ausencia de un dosel arbóreo denso pudiera influir negativamente en el contenido en materia orgánica de XZF. La existencia en este sitio de pies sueltos de roble que no forman ni tan siquiera una formación boscosa abierta permitiría conjeturar que la cantidad de producción vegetal primaria depositada en el suelo es menor en comparación con la correspondiente a una formación boscosa cerrada como la de HAF. Sin embargo, la proporción de materia orgánica promedio registrada en XZF fue similar a la registrada en los sitios cubiertos por formaciones más pobladas (HAF y BRF). Cabe destacar que pese a tratarse de pies de roble aislados que no constituyen una masa forestal densa, los individuos localizados en XZF tienen una edad máxima de 50 años, superior en todo caso a aquellos de BRF, y por ende una superficie de copa mayor por cada individuo. Este hecho junto con la considerable cobertura de matorral característica de XZF podría justificar la ausencia de diferencias significativas entre los sitios, en términos de contenido en materia orgánica del suelo. Sin embargo, considerando las determinaciones realizadas y la historia de las áreas montañosas en estudio, no es posible dilucidar con certeza qué factores son los que determinan los niveles de materia orgánica detectados.

En los estudios de ecología y diversidad procariota, para la realización de análisis inferenciales sobre una población a partir de un conjunto de muestras, es preciso obtener la mayor representatividad posible del ecosistema en estudio. En el caso de muestras de suelo – uno de los ecosistemas terrestres que alberga las comunidades microbianas más diversas – un esfuerzo de muestreo profundo es crucial para obtener resultados fiables. En el caso particular de las aproximaciones basadas en secuenciación masiva, la representatividad absoluta de la comunidad procariota propia de un ecosistema sería lograda cuando cada una de las secuencias del conjunto de datos obtenido fuera leída al menos dos veces (Hughes *et al.*, 2001), alcanzándose por tanto un valor de 100% de la cobertura de Good. Dados los altos valores de cobertura registrados en este estudio (en torno al 83-96%, ver Tabla II.2), se podría considerar que las poblaciones originales de la rizosfera del roble melojo se encuentran considerablemente representadas y que una gran parte de la diversidad procariota total se encuentra cubierta. Las curvas de rarefacción demostraron que con la cantidad de lecturas de calidad obtenidas no es posible detectar el 100% de los OTUs que componen las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo (Figura II.2). Sin embargo, la tendencia asintótica de las curvas de rarefacción (especialmente aquellas concernientes a las librerías de DNA) pone de manifiesto que el esfuerzo de muestreo realizado fue suficiente para obtener una buena caracterización de dichas comunidades.

Las curvas de rarefacción permitieron deducir que, a igual esfuerzo de muestreo, la riqueza de todas las comunidades era muy similar (especialmente en el caso de las librerías de DNA), sin observarse diferencias sustanciales entre las muestras de los diferentes sitios. Así pudo ser confirmado mediante el análisis de los índices de diversidad α (Tabla II.2). Los valores igualmente altos del índice de Shannon y Pielou para los tres sitios estudiados (librerías de DNA) pusieron de manifiesto la elevada riqueza y equidad de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica* pese a tratarse de árboles de diferentes edades y que constituyen formaciones de distinta índole. Tal y como es habitual en ecosistemas forestales, se pudo apreciar elevados

niveles de equidad en las comunidades procariotas analizadas, no observándose dominancia de ningún OTU en ninguno de los sitios en estudio. Cabe destacar que niveles parecidos de riqueza estimada y equidad han sido previamente registrados para comunidades procariotas que habitan la rizosfera de otras quercíneas como *Q. ilex* subsp. *ballota* en otra zona del Parque Nacional de Sierra Nevada (Fernández-González *et al.*, 2017). Resultados similares han sido también observados previamente tanto para la rizosfera de especies leñosas perennes como caducas (Wei *et al.*, 2017). En la misma línea, numerosos ejemplos de comunidades procariotas altamente diversas podrían enumerarse, y es que tal y como revisaron Lladó y colaboradores (2017), los suelos forestales se encuentran entre los hábitats terrestres de mayor diversidad microbiana, en los cuales las bacterias son el grupo más abundante de microorganismos.

En líneas generales, los miembros activos de una comunidad procariota constituyen un subconjunto de la población total, y por tanto inicialmente se podría plantear que la diversidad de la subpoblación activa es inferior a la de la población total. Sin embargo, el valor del estimador Chao-1 y de los índices de diversidad obtenidos para las muestras derivadas del rRNA fueron tan altos como los calculados para las librerías de DNA. Si bien en el caso del robledal maduro se pudo detectar que las comunidades potencialmente activas eran significativamente menos equitativas que las comunidades totales (Tabla II.2), la magnitud de dicha diferencia fue relativamente leve. Dichas ligeras diferencias no fueron observadas para ninguno de los otros sitios estudiados, lo que pone de manifiesto que las comunidades procariotas potencialmente activas de la rizosfera de roble melojo eran prácticamente tan diversas como las comunidades totales. Estas observaciones se encuentran en línea con los resultados obtenidos por otros autores que compararon las comunidades procariotas totales y potencialmente activas en un bosque tropical (DeAngelis y Firestone, 2012) y en un bosque dominado por arce azucarero (*Acer saccharum*) (Romanowicz *et al.*, 2016). Igualmente, Baldrian y colaboradores (2012) también descubrieron un patrón similar de diversidad entre las poblaciones totales y las potencialmente activas que habitan la rizosfera de otra especie forestal, *Picea abies*. Tomando todas las observaciones en conjunto se podría teorizar sobre la posibilidad de que a pesar de que solo una parte de las comunidades procariotas podría hallarse metabólicamente activa, dicho subconjunto no se encontraría dominado por ciertos OTUs concretos de un taxón determinado. Es decir, diferentes OTUs pertenecientes a taxones distintos podrían contribuir a la funcionalidad de la comunidad en el momento concreto del muestreo realizado.

La comparación de los índices de diversidad α dejó entrever que en cuestión de diversidad las comunidades procariotas de la rizosfera de los diferentes tipos de roble son muy similares entre sí, al igual que lo son las comunidades totales y potencialmente activas de cada sitio. Sin embargo, los análisis PCoA y PERMANOVA revelaron que la estructura de las mismas es diferente en cierto grado. Ambos análisis demostraron que el tipo de formación o la edad de los robles no tienen tanta influencia en la diversidad β como lo tiene el tipo de ácido nucleico o librería en estudio. Las muestras rizosféricas obtenidas de las formaciones más densas (HAF y BRF) no se agrupaban entre sí y alejadamente de aquellas obtenidas de los pies aislados de roble (XZF). Tampoco así lo hicieron las correspondientes a los robles más jóvenes (XZF y BRF) en relación a aquellas relativas al robledal más longevo (HAF). En el caso de las comunidades potencialmente activas pudo observarse una mayor diversidad de tipo β y cierta

Resultados

separación en el espacio de ordenación de las muestras correspondientes a los robles más jóvenes (BRF) de las de los robles de HAF (Figura II.3). La separación de las muestras a lo largo del eje 2 del PCoA conforme aumenta la edad de los hospedadores (especialmente en el caso de las librerías de RNA) podría sugerir una progresión de las comunidades con la edad de los árboles. Sin embargo, el bajo nivel de replicación que dificultó el análisis estadístico, y el porcentaje relativamente bajo de varianza explicada por la coordenada 2 (17.6%) impiden la obtención de resultados completamente concluyentes. Así pues, pese a determinar que la estructura de las comunidades procariotas era estadísticamente diferente, no fue posible determinar con absoluta fiabilidad si dichas diferencias se hallan entre robles de diferentes edades (como sugiere la distribución de las muestras en el PCoA), o entre robles que constituyen diferentes tipos de formaciones.

Mucho esfuerzo se ha realizado en el ámbito de la ecología microbiana para intentar comprender cuáles son los principales factores que determinan la estructura de las comunidades procariotas del suelo y la rizosfera de diferentes plantas. Tal y como se revisa en los trabajos de Philippot y colaboradores (2013) y Lladó y colaboradores (2018), diversos factores bióticos y abióticos como la especie vegetal hospedadora, incluso el genotipo o cultivar concreto, la exudación o la toma de agua y nutrientes por las raíces, las propiedades fisicoquímicas del suelo, el tipo de manejo del mismo o las condiciones climáticas pueden regir la estructura de las comunidades procariotas. A su vez, las interacciones que tuvieron lugar en la rizosfera de las plantas de generaciones pasadas podrían también tener reflejo en las comunidades procariotas actuales. En el caso específico de los suelos forestales, las diferentes especies vegetales que componen las masas boscosas (Li *et al.*, 2014) así como las distintas etapas de la sucesión forestal (Smithwick *et al.*, 2005; White *et al.*, 2005) son factores que pueden condicionar la estructura poblacional microbiana. Incluso la edad de los árboles ha sido considerada como un factor influyente en diferentes aspectos ecosistémicos. Árboles de la especie *Platycladus orientalis* de 20 y más de 1000 años resultaron diferentes significativamente en cuanto a la estructura de las comunidades bacterianas que habitaban la rizosfera, así como en la correspondiente concentración de nutrientes (Liu *et al.*, 2018). Por consiguiente, las diferencias observadas en las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo podrían ser debidas a multitud de factores, por ejemplo, a la edad de los árboles o a la diferente historia de los sitios en estudio, e incluso debidas a factores no contemplados en este trabajo.

Gran parte de los factores mencionados puede tener reflejo en las propiedades fisicoquímicas del suelo, las cuales han sido intensamente estudiadas en los análisis de comunidades procariotas asociadas a especies vegetales (Girvan *et al.*, 2003; Fierer y Jackson, 2006; Rousk *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Romanowicz *et al.*, 2016; Cobo-Díaz *et al.*, 2017; entre otros). A diferencia de lo habitualmente documentado en estudios como los recién citados, la estructura de las comunidades procariotas totales (DNA) no se encontraba condicionada por ninguna de las variables edáficas estudiadas (Apartado II.3.4.), si bien las poblaciones potencialmente activas (RNA) se encontraban de forma significativa bajo la influencia del pH y del contenido en materia orgánica. El material genético de células en dormancia, de células muertas y el DNA extracelular que forma parte de las librerías de DNA pero no de aquellas de RNA podría enmascarar en cierto modo el efecto de ciertas propiedades fisicoquímicas sobre la estructura y composición

de las comunidades procariotas de la rizosfera. En este sentido, previamente se ha demostrado mediante estudios multidisciplinarios que la composición de la comunidad procariota total de un suelo forestal dominado por *Pinus halepensis* se ve menos afectada por la sequía que la correspondiente población activa, y es conocido que las precipitaciones se hallan implicadas en la regulación del contenido en C y N del suelo (Bastida *et al.*, 2017). Igualmente, otros autores revelaron mediante métodos basados en RNA que las poblaciones potencialmente activas responden más intensamente que las comunidades procariotas totales también a la sequía (Romanowicz *et al.*, 2016). Por tanto, teniendo en cuenta todo lo anterior se podría especular que los parámetros edáficos como los aquí analizados podrían ejercer una mayor influencia sobre las comunidades procariotas rizosféricas a nivel metabólico que a nivel estructural o de ensamblaje de las comunidades procariotas (rDNA). No puede, sin embargo, descartarse el efecto de determinados factores sobre las comunidades procariotas totales, como la interacción con otros organismos (desde otras bacterias u otros microorganismos hasta incluso animales), factores climáticos, estacionales y otros parámetros no medidos en este trabajo.

Una de las propiedades edáficas más ampliamente estudiadas es el pH, el cual a su vez puede ser el resultado de la suma de diversos factores bióticos y abióticos, como el tipo de vegetación en el suelo, la disponibilidad de nutrientes o el régimen de humedad del suelo (Lauber *et al.*, 2008; Rousk *et al.*, 2010). Es bien conocido que los perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas del suelo se ven influidos en gran medida por el pH del mismo (Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009; Nacke *et al.*, 2011; entre otros). Una posible causa de ello es que la mayoría de los taxones bacterianos muestran rangos de tolerancia al pH considerablemente estrechos (Rousk *et al.*, 2010). Valores extremos de pH podrían suponer un estrés para las células bacterianas del suelo, siendo seleccionados algunos taxones sobre otros a determinados rangos de pH (Lauber *et al.*, 2008). En el caso de la rizosfera de *Q. pyrenaica*, el análisis CAP permitió deducir que el pH y el contenido en materia orgánica son parámetros edáficos predictores de la estructura y composición de las comunidades procariotas potencialmente activas. Así pues, cambios en el pH y MOS podrían suponer cambios en la estructura de las poblaciones potencialmente activas, siendo esperable, de forma teórica, comunidades similares a las del robledal maduro (HAF) conforme aumenta el valor de ambos parámetros.

Conocidos los factores estructuradores de las comunidades procariotas de la rizosfera, se procedió a analizar los perfiles taxonómicos de las mismas, tanto a nivel de sitio de estudio como a nivel de tipo de comunidad procariota (total o potencialmente activa). A rangos taxonómicos elevados, ambos tipos de poblaciones resultaron diferentes en cuanto a la abundancia relativa de algunos taxones (Tabla II.3), si bien las dos se encontraban compuestas por los mismos *phyla* mayoritarios en cada uno de los sitios analizados. Además, previamente ya se ha descrito que algunos de los *phyla* que dominaban la rizosfera de *Q. pyrenaica* en HAF, BRF y XZF (tanto a nivel de DNA como de RNA) se encuentran enriquecidos en el suelo rizosférico de otras quercíneas, especialmente *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* (Uroz *et al.*, 2010; Meaden *et al.*, 2016). En el caso concreto de la rizosfera de roble melojo, Cobo-Díaz y colaboradores (2017) detectaron un porcentaje de secuencias adscritas al *phylum* *Actinobacteria* superior a los valores aquí registrados, mientras que la abundancia

Resultados

relativa de *Acidobacteria* documentada por aquellos autores era aproximadamente tres veces inferior a la detectada en este trabajo. Pese a que los sitios estudiados eran exactamente los mismos (HAF, XZF) ambos muestreos fueron realizados en momentos distintos y la estrategia de secuenciación masiva seguida fue también diferente. Así pues, las diferencias observadas con respecto a aquellos autores podrían ser debidas a aspectos metodológicos y/o a factores no contemplados en este trabajo.

Cabe destacar que los principales *phyla* detectados en la rizosfera de *Q. pyrenaica* fueron prácticamente los mismos que caracterizan de forma genérica los suelos forestales (Lladó *et al.*, 2017) y la zona de influencia de la raíz de una amplia variedad de hospedadores vegetales (Lundberg *et al.*, 2012; Zarraonaindia *et al.*, 2015; Coleman-Derr *et al.*, 2016). En concreto, *Proteobacteria* es considerado uno de los *phyla* más comunes que habitan el suelo (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018), la rizosfera, así como diferentes órganos vegetales (Zarraonaindia *et al.*, 2015; Coleman-Derr *et al.*, 2016). Por ello, tal y como sugieren Coleman-Derr y colaboradores (2016) ciertas fuerzas conservadas podrían determinar la estructura de las poblaciones bacterianas asociadas a las plantas, pudiéndose considerar los mencionados taxones parte de la microbiota vegetal generalista.

Tal y como se ha expuesto anteriormente, es conocido que el estado de desarrollo de la planta hospedadora así como la edad de la misma pueden determinar la estructura de las comunidades procariotas de la rizosfera de diferentes plantas, desde gramíneas y tubérculos (Herschkovitz *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2014) hasta especies leñosas (Zhou *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Sin embargo, sería de esperar que la microbiota esencial o *core* fuera común independientemente de dichos factores o de otros como las características propias al lugar de estudio. En el presente caso, de forma similar a lo que revelaron Delgado-Baquerizo y colaboradores (2018) a escala global, menos del 18% de los OTUs registrados se encontraban presentes en los tres sitios montañosos estudiados; sin embargo, dicha minoría se encontraba representada por una alta proporción de secuencias de rDNA así como de las derivadas del rRNA (Figura II.6A y B). De esta manera se pone de manifiesto que solamente una proporción relativamente baja de OTUs dominan la rizosfera de *Q. pyrenaica* en el momento del muestreo. Esto es, tan solo unos pocos resultaron ubicuos, encontrándose en la rizosfera de robles de diferente edad que constituyen formaciones forestales de diferente tipo en el Parque Nacional de Sierra Nevada. Estos resultados se encuentran en consonancia con los aportados previamente por Herzog y colaboradores (2015) sobre las comunidades procariotas totales y potencialmente activas del suelo de un pastizal. Sin embargo, el presente trabajo es el primero dirigido hacia el estudio del *core* bacterioma de una especie forestal. En el caso del *core*-bacterioma potencialmente activo (*core*-RNA) destaca la dominancia del *phylum Proteobacteria*, el cual supuso aproximadamente la mitad de las secuencias del correspondiente *core* (Figura II.7). Cabe destacar que este resultado se encuentra en línea con los obtenidos por Bastida y colaboradores (2017) para un bosque de *Pinus halepensis*, donde mediante métodos más directos para estimar la actividad bacteriana (metaproteómica) fueron registrados valores similarmente altos de abundancia de este *phylum* (61%).

Sobre el hipotético papel o influencia que la microbiota central o *core* ejerce sobre su hospedador se ha especulado repetidamente. Así como se ha sugerido que la

microbiota *accesoria* podría encontrarse definida fundamentalmente por microorganismos o funciones más prescindibles en cuanto a las interacciones planta-microorganismo o incluso ecosistema-microorganismo, a los microorganismos *core* se les presupone un papel esencial en su relación con el hospedador (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). Por ello, con el objetivo de identificar aquellos OTUs de hipotética relevancia y que podrían encontrarse presentes y metabólicamente activos en la rizosfera de roble melojo en el momento de muestreo, una vez definidos se compararon el *core*-DNA y el *core*-RNA. Aproximadamente un 44% de los OTUs que formaban el *core*-DNA no fueron identificados en el *core*-RNA, debido posiblemente a que la cantidad de secuencias derivadas del rRNA se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica de secuenciación masiva empleada, o a que dichos OTUs no cumplían los criterios estipulados para ser considerados *core*-procariotas, entre otros posibles motivos. En sentido opuesto, cerca de un 32% de los OTUs fueron clasificados como *phantom taxa*, proporción similar a la detectada en muestras de suelo rizosférico de *Phaseolus vulgaris* (Bowsher *et al.*, 2019), aunque dichos autores no se centraron específicamente en el *core*-bacterioma de dicho hospedador. Cabe destacar que los taxones fantasma fueron eliminados de los subsiguientes análisis perdiendo posiblemente parte de los individuos que podrían encontrarse metabólicamente activos en la rizosfera de *Q. pyrenaica*. Así pues, tan solo se tuvieron en cuenta los 593 OTUs que fueron detectados en ambos *core*-bacteriomas, ahondando en el posible estatus metabólico de los mismos.

En la actualidad existe una tendencia creciente a indagar sobre los taxones metabólicamente activos que caracterizan las comunidades microbianas que habitan diferentes nichos ecológicos (Baldrian *et al.*, 2012; Hunt *et al.*, 2013; Herzog *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2016; entre otros). La relación rRNA:rDNA es una de las herramientas que actualmente se están empleado para inferir, de forma aproximada, el estado de actividad de las células procariotas. En este contexto, Steven y colaboradores (2017) destacan que las interpretaciones basadas en el ratio rRNA:rDNA deben realizarse con cautela. Dichos autores declaran que en el caso de comunidades procariotas complejas – como lo son la mayoría de las comunidades terrestres, por la gran diversidad fisiológica y diferentes tasas de crecimiento que caracterizan a los miembros de la comunidad –, existe un fuerte sesgo o proporción de falsos negativos al catalogar los individuos como activos. Esto es, a partir del ratio rRNA:rDNA se tiende a clasificar erróneamente como células en dormancia a determinadas células que podrían encontrarse activas. Sin embargo, el método se mantiene sólido y fiable en el caso de la delimitación de las células como metabólicamente activas. Por otro lado, Papp y colaboradores (2018) llegaron a conclusiones muy similares ya que fueron capaces de detectar que taxones con un bajo ratio rRNA:rDNA asociado se encontraban sintetizando nuevos ácidos nucleicos, y por lo tanto se trataba de individuos activos metabólicamente, pese a lo que a partir del ratio se podría deducir. Ambos trabajos, por lo tanto, defienden que la inferencia en base a la relación rRNA:rDNA puede conducir a una subestimación de la cantidad total de OTUs activos. Por otro lado, ha sido previamente demostrado que valores conservadores de la relación rRNA:rDNA permiten obtener perfiles ecológicos fiables aunque reducidos (Kearns *et al.*, 2016; Bowsher *et al.*, 2019), por lo que en el presente trabajo se procedió a analizar en detalle tan solo aquellos OTUs con un ratio rRNA:rDNA asociado superior o igual a 2. Consecuentemente, debe advertirse que la aproximación llevada a cabo en el presente trabajo posiblemente refleje tan solo una

Resultados

limitada pero consistente parte del total de OTUs potencialmente activos del procarioma rizosférico del roble melojo. Del total de OTUs que formaban parte del *core*-compartido, tan solo una pequeña proporción apuntaba a encontrarse activo ($\approx 26.5\%$ OTUs cuyo ratio rRNA:rDNA asociado era ≥ 2). Algunos autores sugieren que la inmensa mayoría de los individuos de una comunidad microbiana se encuentra en dormancia, incluso en diferentes ecosistemas, representando por tanto los metabólicamente activos una pequeña parte de la comunidad total (Lennon y Jones, 2011; Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013). Pese a que los resultados obtenidos en este trabajo pudiera parecer que se encuentran en línea con las observaciones de dichos autores, estos deben tomarse con cautela teniendo en cuenta la subestimación realizada de los taxones activos al calcularse el ratio rRNA:rDNA.

Valores altos del ratio rRNA:rDNA pueden obtenerse para aquellos taxones escasamente abundantes en el ecosistema en estudio (frecuentemente conocidos como miembros de la *biosfera rara* u *OTUs raros*, según revisaron Lynch y Neufeld, 2015) que se hallan metabólicamente activos. En la rizosfera de *Q. pyrenaica*, la mayoría de los OTUs con un ratio rRNA:rDNA superior o igual a 2 podrían ser miembros de la biosfera rara, ya que tan solo 15 de los 157 OTUs que superaban dicho valor del ratio se encontraban representados por más de un 0.1% de las secuencias detectadas en ambas librerías.

Los OTUs raros que forman parte de la biosfera rara son frecuentemente descartados de los análisis de comunidades bacterianas, ya que son considerados de poca importancia en los ecosistemas naturales (Hunt *et al.*, 2013). Sin embargo, la abundancia relativa de los taxones que componen una población no necesariamente refleja la contribución o el rol de los mismos en el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas. Tal es así que los individuos menos comunes de una población pueden ejercer una gran influencia en su medio local. La biosfera rara desempeña un papel esencial en la conservación de la diversidad α y β de las comunidades, siendo una importante fuente de diversidad no solo genética sino también metabólica (Elshahed *et al.*, 2008). Ello conlleva a que en última instancia a los microorganismos menos abundantes se les haya atribuido puntualmente la capacidad de responder a alteraciones de origen biótico y abiótico, y por ende, contribuyan de forma sustancial tanto a la ecología como a la resiliencia de las comunidades (Lynch y Neufeld, 2008). Así pues, el papel de la biosfera rara remarca la necesidad de mantener este tipo de taxones en los análisis de ecología microbiana. En el caso de la rizosfera de *Q. pyrenaica*, 15 de los 157 OTUs del *core*-compartido además de encontrarse en muy baja abundancia, se encontraban muy representados en las librerías de RNA (Figura II.10C), lo cual hizo que el análisis de la adscripción taxonómica de los mismos mereciera la atención.

En el caso de la rizosfera de roble melojo uno de los géneros para los cuales se detectó un mayor número de OTUs con alto ratio asociado fue *Phenylobacterium*. Este hecho junto con la implícita baja abundancia relativa con que dichos OTUs fueron detectados (a nivel de DNA) ponen de manifiesto nuevamente que algunos miembros de la biosfera rara podrían ser potencialmente más activos de lo que *a priori* harían pensar las estrategias basadas exclusivamente en DNA. Este género bacteriano es frecuentemente detectado en suelos forestales como los de bosques de hayas,

coníferas y de selvas atlánticas (Baldrian *et al.*, 2012; Štursová *et al.*, 2012; Etto *et al.*, 2014; Nacke *et al.*, 2014). Además, otros autores han documentado una mayor proporción de secuencias de este género en librerías derivadas de rRNA que en las correspondientes de DNA (Baldrian *et al.*, 2012). Asimismo, *Phenylobacterium* ha sido detectado en la fracción activa del suelo de un bosque de *Picea abies* (Štursová *et al.*, 2012), siendo por lo tanto prometedor su papel potencial en el ecosistema forestal.

Aunque el papel que desempeñan las especies del género *Phenylobacterium* en los nichos ecológicos que habitan no ha sido descifrado aún, Verastegui y colaboradores (2014) han considerado este género como indicador de actividad en varios suelos forestales, destacando que se podría encontrar implicado en la metabolización de la celulosa. Por otro lado, es conocido que algunas especies adscritas a este género son capaces de degradar compuestos fenólicos (Lingens *et al.*, 1985), algunos de los cuales son sintetizados por hongos que han sido aislados de suelos y de la materia vegetal en descomposición (Wegst y Lingens, 1983). Cabe mencionar que las hojas de diferentes quercíneas (Ishikura *et al.*, 2001) y la madera de *Q. pyrenaica* se caracterizan por incluir en su composición un amplio rango de compuestos fenólicos diferentes (Fernández de Simón *et al.*, 1996), por lo que no sería de extrañar que las especies pertenecientes a este género bacteriano se encontraran implicadas en la degradación de los compuestos fenólicos constituyentes de la biomasa de roble melojo. Sin embargo, con la aproximación desarrollada en este trabajo no es posible determinar el papel específico de los OTUs adscritos al género *Phenylobacterium*.

Destaca por otro lado la considerable cantidad de OTUs pertenecientes al orden *Myxococcales* candidatos a encontrarse activos. Si bien los valores del ratio rRNA:rDNA sugieren que dichos OTUs podrían encontrarse activos en el ecosistema en estudio, la incapacidad para clasificar los mismos en rangos taxonómicos más profundos dificultó en gran medida la teorización sobre su contribución ecosistémica. De forma genérica, las myxobacterias son conocidas por la capacidad de excretar en ecosistemas naturales exoenzimas como proteasas, lipasas o glucanasas que actúan sobre otras células vivas (actividad bacteriolítica). Otras son capaces de producir enzimas implicados en la hidrólisis del almidón, xilano, quitina o incluso celulosa, así como por la producción de una amplia diversidad de moléculas bioactivas con actividad antimicrobiana (Dawid, 2000).

El ratio asociado a algunos de los 157 OTUs del *core*-compartido resultó considerablemente elevado (Figura II.9). Este hecho supone una gran desproporción de secuencias derivadas del rRNA respecto a las de rDNA, resultando tentador clasificar los OTUs con un alto valor del ratio asociado como metabólicamente muy activos. Sin embargo, pese a que valores desproporcionados del ratio rRNA:rDNA han sido registrados anteriormente con relativa frecuencia para taxones que habitan en diferentes ecosistemas (Jones y Lennon, 2010; Campbell *et al.*, 2011; Besemer *et al.*, 2012; Wilhem *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2016), la proporción rRNA:rDNA no debe emplearse como medida de la actividad específica o nivel de actividad del taxón correspondiente. Entre otros factores, dos especies con el mismo valor de la proporción rRNA:rDNA pueden mostrar un diferente grado de actividad, y una insuficiente profundidad de muestreo puede alterar dramáticamente los valores de dicho ratio (Steven *et al.*, 2017).

En definitiva, mediante la combinación de técnicas de *metabarcoding* basadas en DNA y en RNA fue posible observar que las comunidades procariotas potencialmente activas de la rizosfera de *Q. pyrenaica* son tan ricas y diversas como las poblaciones totales, si bien ambas resultaron diferentes en cuanto a su estructura. A pesar de las diferencias encontradas también entre las comunidades que habitan la rizosfera de árboles que conforman distintos tipos de formaciones, fue posible definir el *core* procarioma total y potencialmente activo del roble melojo, demostrando que ambos se encuentran compuestos por una cantidad relativamente baja de taxones muy abundantes. Teniendo presente las limitaciones propias de la aproximación basada en el ratio rRNA:rDNA, la desproporción observada entre la abundancia relativa de algunos taxones determinada en base al rDNA y a las secuencias derivadas del rRNA puede ayudar a la comunidad científica a obtener una visión más extensa de las comunidades procariotas asociadas a hospedadores vegetales. Así, algunos organismos procariotas tradicionalmente eliminados de los estudios dada su escasa abundancia relativa (DNA), pueden encontrarse altamente representados en las librerías de RNA. En este caso, determinados miembros de los órdenes *Caulobacterales* (especialmente varios OTUs del género *Phenylobacterium*) y *Myxococcales* exhibieron un alto ratio rRNA:rDNA, lo cual apunta a que dichos taxones deberían ser tenidos en consideración en futuros análisis para determinar su posible papel y contribución tanto al *fitness* general del roble melojo como al ecosistema en estudio.

II.5. Perspectivas futuras

El presente estudio aborda, de forma reduccionista, la descripción del procarioma de la especie leñosa *Q. pyrenaica* en el Parque Nacional de Sierra Nevada. Para ello, se seleccionaron árboles de diferentes edades y que formaban parte de distintas formaciones forestales. Así pues, se trata de un estudio limitado, pues para la descripción de la microbiota rizosférica asociada a esta especie leñosa, sería recomendable analizar un mayor número de árboles, localizados a lo largo de toda la corología del roble melojo, y preferentemente sujetos a diferentes condiciones ambientales. Es así, cubriendo la mayor diversidad de condiciones posible, cuando sería viable definir el auténtico *core* procarioma rizosférico de esta quercínea, identificando por tanto los taxones que pudieran encontrarse asociados a las raíces del hospedador aún en condiciones absolutamente diferentes. A su vez, la obtención de una visión más amplia de la microbiota que habita la rizosfera del roble melojo requeriría el análisis de los microorganismos más numerosos en los suelos forestales. Entre estos se deberían incluir las comunidades fúngicas, sin descartar virus ni protistas, así como realizar un análisis más pormenorizado del dominio procariota Archaea (Baldrian, 2016). Mención especial reciben los hongos que establecen la simbiosis ectomicorrícica, ya que más del 90% de los árboles de bosques templados y boreales forman parte de este sistema simbiótico (Lladó *et al.*, 2017). Dado que las quercíneas son críticamente dependientes de los hongos ectomicorrícicos para aumentar la superficie absorptiva de las raíces y por ende intensificar la adquisición de nutrientes (Smith y Read, 2000), su inclusión en posteriores estudios sería altamente recomendable. De esta manera, sería posible obtener una visión más completa del holobionte en consideración.

El análisis comparado del *core*-DNA y *core*-RNA y el subsiguiente cálculo del ratio rRNA:rDNA tuvo como meta principal la identificación de aquellos OTUs que

podrían encontrarse activos en la rizosfera de roble melojo. Si bien dicho ratio ha sido calculado en varios trabajos anteriores, sus limitaciones hacen que este solo pueda ser empleado para la clasificación de individuos en base a su estado de actividad. La subestimación del porcentaje de taxones activos asociada al cálculo del ratio, así como la falta de datos certeros sobre los organismos procariotas en estado de dormancia, ponen de manifiesto la necesidad de implementar otros métodos más completos y directos para poder describir en su totalidad las comunidades procariotas realmente activas metabólicamente. En esta línea, sería recomendable el estudio de la población activa mediante técnicas que permitieran detectar productos directos del metabolismo, entre las que se proponen técnicas de metatranscriptómica, metaproteómica o metabolómica.

No obstante lo anterior, el cálculo del ratio permitió identificar los OTUs candidatos a ser activos en el ecosistema estudiado. Así pues, la proporción rRNA:rDNA permitió apreciar que *Phenylobacterium* es el género taxonómicamente descrito representado por un mayor número de OTUs con ratio superior o igual a 2. Dado que se trata de candidatos a ser activos en el ecosistema en estudio y pertenecientes a un género conocido, ensayos futuros deberían realizarse para verificar la hipótesis sobre su potencial metabólico. Sería por tanto conveniente aislar en cultivo puro cepas correspondientes a dichos OTUs (o pertenecientes al menos al mencionado género), para posteriormente caracterizar su potencial metabólico ahondando en la capacidad de degradar la materia orgánica y en concreto, compuestos fenólicos. En un sentido más amplio, los análisis futuros deberían encontrarse enfocados hacia el estudio de la ecología de este género en el ecosistema rizosférico, así como a la comprensión de su papel como miembro del core bacterioma de la rizosfera de *Q. pyrenaica*.

Cabe destacar que la diversidad microbiana no tiene por qué ser absolutamente informativa del estado de un ecosistema concreto. A la vista de los resultados obtenidos se deduce además que no solo la presencia del DNA bacteriano, ni tan siquiera la presencia de los procariotas vivos, es suficientemente explicativa de su importancia en la rizosfera. A su vez, el análisis individualizado de los microorganismos que podrían ejercer un efecto promotor sobre el crecimiento vegetal no siempre refleja la importancia de los taxones concretos. La funcionalidad de la microbiota de una planta no puede considerarse como la suma de las funciones desempeñadas por los microorganismos que la componen, ya que estos frecuentemente interactúan con el resto de miembros de la población. Dichas interacciones pueden modular el efecto individualizado de cada uno de ellos (positiva o negativamente), influyendo por tanto en cada miembro y teniendo consecuencias directas sobre la fertilidad del suelo y el *fitness* del hospedador (van der Heijden y Hartmann, 2016). Es decir, ciertos microorganismos pueden no ejercer un efecto beneficioso directo sobre el crecimiento vegetal, pero podrían encontrarse involucrados en el correcto ensamblaje de la comunidad, desempeñando por lo tanto un papel esencial en la misma (Toju *et al.*, 2018). Aquellos microorganismos que con frecuencia co-existen con muchos otros, es esperable que sean piezas clave de la microbiota considerada, dado que podrían interactuar con otros individuos y ejercer efectos regulatorios sobre el resto de la microbiota. Así pues, sería recomendable que futuros diseños experimentales incluyeran el análisis de redes de co-ocurrencia que permitan identificar los microorganismos clave en base a la correlación entre la abundancia relativa de los mismos.



CAPÍTULO III

Estudio del efecto de la inoculación de un consorcio bacteriano sobre las comunidades procariotas rizosféricas de *Quercus pyrenaica* en condiciones de campo

La imagen muestra un plantón de *Quercus pyrenaica*.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

III.1. Introducción

Ante los constatados y previstos efectos del cambio global sobre los bosques mediterráneos, urge el desarrollo e implementación de estrategias de gestión de las masas boscosas. En el caso de especies arbóreas como *Q. pyrenaica*, cuyos bosques muestran un preocupante estado de deterioro, se han propuesto varios modelos de gestión de las mismas. Tal y como se ha comentado en el Apartado 1.1.1.3.2., una de las estrategias de gestión consiste en la repoblación con individuos de esta especie para lograr, por ejemplo, la expansión altitudinal de la misma. Sin embargo, las repoblaciones en el área mediterránea tienen asociadas una alta tasa de mortalidad temprana de las plantas, haciendo de este un proceso de bajo rendimiento tanto en términos ecológicos como económicos (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004).

La mejora del éxito de las tareas de repoblación forestal con plántones procedentes de vivero puede ser lograda mediante manejo de la microbiota de la propia planta. Ello puede conseguirse mediante estimulación de la actividad microbiana o bien a través de la inoculación de los plántones con microorganismos seleccionados por sus beneficios para el hospedador (Maghnia *et al.*, 2019). Este último método puede suponer la obtención de plántones que crecen más rápido o son más resistentes a condiciones de estrés biótico o abiótico, como el que sufren los plántones cuando son transferidos a campo (Karličić *et al.*, 2016; Maghnia *et al.*, 2019). Sin embargo, el desarrollo de bioformulaciones de aplicación agrícola o silvícola presenta en la actualidad ciertos cuellos de botella y abundantes lagunas de conocimiento. Las principales barreras para el uso extendido de las bioformulaciones incluyen la baja fiabilidad y la dificultad para determinar su eficacia en condiciones de campo. Así pues, en la búsqueda del bioinoculante ideal los interrogantes que con mayor frecuencia se persiguen responder atañen a las diferentes etapas que comprenden la formulación del mismo, desde la búsqueda de los mejores candidatos microbianos hasta la producción en grandes cantidades y modo de aplicación del producto obtenido (Kaminsky *et al.*, 2019). Sin embargo, los rasgos que afectan a la ecología de los inoculantes microbianos son generalmente pasados por alto, por lo que esta tecnología a día de hoy adolece de una visión integrada de los múltiples aspectos que la componen. Así, el impacto a largo plazo que la aplicación de dichas bioformulaciones puede tener sobre el ecosistema en consideración es uno de los aspectos más frecuentemente ignorados.

La interacción que el microorganismo o consorcio microbiano establece con la microbiota nativa o autóctona del hábitat donde va a ser aplicado, es uno de los factores que pueden afectar a la eficiencia del propio bioinoculante. Por ejemplo, los microorganismos introducidos pueden ser eliminados de dicho hábitat por la microbiota nativa debido a fenómenos de competición entre ambos (Maghnia *et al.*, 2019). Además, la introducción de microorganismos en un hábitat natural puede tener importantes consecuencias ecológicas, que por otra parte, son generalmente poco estudiadas. Si en la formulación del bioinoculante se incluyen microorganismos externos o foráneos al hábitat donde van a ser introducidos, es posible que tenga lugar un evento de invasión microbiana, pudiendo desencadenar un desplazamiento de los microorganismos autóctonos o nativos. Si uno de los microorganismos afectados es de los denominados *keystone species* o especie clave que desempeña un papel crucial en el mantenimiento del equilibrio de la comunidad nativa, entonces es posible que tenga lugar una fuerte

Resultados

alteración del funcionamiento del ecosistema (Mallon *et al.*, 2015). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que la abundancia de ciertos taxones que forman parte de la microbiota de las plantas se puede encontrar correlacionada con la de otros microorganismos, incluidos patógenos. Así, el aumento de la abundancia de algunos miembros de la comunidad puede dar lugar en última instancia a la aparición o desarrollo de microorganismos que ejercen un efecto negativo sobre el hospedador (van der Heijden y Hatmann, 2016).

Sin embargo, el efecto que la aplicación de un bioinoculante ejerce sobre la comunidad microbiana nativa no siempre tiene porqué ser negativo. Experimentos en invernadero han demostrado que la introducción de un inoculante bacteriano supone una alteración de la diversidad de la comunidad procariota de la rizosfera de plantas de maíz, siendo el signo de dicha alteración dependiente del método de introducción del inoculante (Ciccillo *et al.*, 2002). Otros autores han podido observar cómo la introducción de un microorganismo invasor en el suelo supone un aumento de la diversidad de la comunidad procariota residente, suponiendo al mismo tiempo un incremento de la abundancia relativa de algunos taxones, pero un descenso en otros casos (Mallon *et al.*, 2018). Así pues, a pesar de la relevancia que el efecto de la inoculación puede tener sobre la microbiota asociada a la planta en estudio, todavía es un aspecto que debe ser estudiado con más detalle ya que los resultados al respecto son escasos, y en ocasiones controvertidos o confusos.

Otro rasgo escasamente tenido en cuenta cuando se desarrollan bioinoculantes es la persistencia a largo plazo del inóculo una vez en campo, así como los factores que afectan a la misma. Los bioinoculantes ideales deben estar compuestos por microorganismos que, entre otros aspectos, sean suficientemente competitivos como para permanecer en las inmediaciones o en asociación con la planta durante gran parte de su periodo vegetativo (Kaminsky *et al.*, 2019), o que sean nativos del nicho donde se van a aplicar y por tanto perfectamente adaptados a las condiciones típicas de dicho hábitat. La reinoculación periódica de las plantas es una tendencia habitual en algunos agroecosistemas, sin embargo en determinados casos dicha reiteración no es necesaria ya que algunas especies son capaces de persistir en suficiente número durante relativamente largos periodos de tiempo (Ulzen *et al.*, 2018). Así, el estudio de la persistencia en campo de los microorganismos inoculados es un aspecto que no debería ser ignorado ya que permitiría optimizar el desarrollo de las bioformulaciones, además de que podría suponer una reducción de la necesidad de adquirir y aplicar nuevamente los bioinoculantes. En el caso concreto de hospedadores de tipo arbóreo, algunos trabajos se han centrado en el estudio de la persistencia de hongos ectomicorrícicos una vez los plantones inoculados son transferidos del vivero al campo. La mayoría de los trabajos demuestran que poco después del trasplante se produce un reemplazo de los hongos ectomicorrícicos inoculados por otros autóctonos (Quoreshi *et al.*, 2008). Sin embargo, la persistencia en campo de inoculantes bacterianos aplicados a plantones de vivero permanece a día de hoy poco estudiada.

Así pues, las incógnitas existentes sobre el efecto positivo, negativo e incluso neutro de la introducción de bioinoculantes sobre la microbiota residente en un hábitat concreto deberían ser resueltas antes de la liberación de los microorganismos en dicho hábitat. Por otro lado, si bien resulta difícil predecir la persistencia de los

microorganismos inoculados en condiciones naturales (Toju *et al.*, 2018), su estudio es recomendado para poder lograr optimizar el proceso de desarrollo de bioformulaciones.

III.2. Diseño experimental

Antes de proceder al complejo proceso que supone el desarrollo de un inoculante bacteriano, se considera oportuno responder a varias cuestiones que pueden afectar al ecosistema y a la eficiencia final del producto. Por un lado, se trató de esclarecer si las comunidades procariotas de la rizosfera de individuos de la especie *Q. pyrenaica* inoculados con un consorcio bacteriano en vivero son diferentes a aquellas correspondientes a individuos no tratados, dos años después de su inoculación y una vez en condiciones naturales. Asimismo, se cuestionó si transcurrido dicho periodo es posible detectar la presencia de los inoculantes bacterianos en la rizosfera de los árboles trasplantados a campo, estudiando la posible abundancia diferencial de los mismos. Por otro lado, se planteó si al cabo de un año y medio en campo las comunidades procariotas de la rizosfera de robles trasplantados se aproximan a las correspondientes a árboles naturalmente presentes o de antiguas repoblaciones. Finalmente, la escasez de conocimiento sobre cuestiones inherentes a las comunidades procariotas asociadas a plantones de repoblación motivó el estudio de ciertos aspectos ecológicos sobre las mismas que a continuación se detallan.

Para resolver dichas cuestiones, se llevó a cabo un abordaje que trató de cubrir las diferentes etapas que comprenden la repoblación de zonas de montaña con plantones inoculados procedentes de vivero. El diseño experimental seguido se expone a continuación, el cual supuso la implementación de la metodología específica descrita en la sección Materiales y Métodos de esta memoria de Tesis.

Estudios previos del grupo de investigación demuestran que el género *Bradyrhizobium* es abundante en la rizosfera de otras quercíneas como la encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*) situadas también en el Espacio Natural de Sierra Nevada (Cobo-Díaz *et al.*, 2015). La familia *Bradyrhizobiaceae* es incluso una de las más abundantes en la rizosfera de *Q. pyrenaica* en diversas localizaciones de este mismo enclave (Cobo-Díaz *et al.*, 2017), habiéndose aislado diferentes cepas del mencionado género en la zona de trabajo experimental, a partir de la rizosfera de la leguminosa arbustiva *Genista versicolor* (Cobo-Díaz *et al.*, 2014). Por otro lado, otros estudios han revelado que tres años después de un incendio, el género *Arthrobacter* es el más abundante en la rizosfera de encinas que rebrotaron después de ser quemadas, sugiriendo un papel restaurador de este género bacteriano. Diferentes cepas del género *Arthrobacter* fueron aisladas, y caracterizadas sus actividades promotoras del crecimiento vegetal (Fernández-González *et al.*, 2017). Así pues, teniendo en cuenta el papel potencial de los dos géneros mencionados en el ecosistema en estudio, se seleccionaron las cepas *Bradyrhizobium canariense* GV101 y *Arthrobacter globiformis* AFG20.1 de las colecciones bacterianas previamente obtenidas por el grupo de investigación.

Plantones de roble obtenidos a partir de bellotas y crecidos en un vivero local fueron inoculados durante la primavera (mayo-junio) de 2013 con el consorcio bacteriano constituido por las cepas *Bradyrhizobium canariense* GV101 y *Arthrobacter globiformis* AFG20.1. Concretamente, 800 plantones fueron inoculados conservando otros tantos sin tratar, siendo por lo tanto los controles negativos de la inoculación.

Resultados

Todos los plantones fueron mantenidos en el vivero hasta que en invierno de ese mismo año (diciembre de 2013) se procedió a las tareas de repoblación forestal.

Para ello, previamente se seleccionaron tres áreas de estudio ubicadas en Sierra Nevada: NPF (pinar en el que se llevaron a cabo tareas de clareo en la primavera del año 2013, tratando de reducir la densidad de pies de pino por hectárea); AZC (zona localizada a una altitud superior al límite altitudinal de *Q. pyrenaica*), en el municipio de Cañar, y AZL (área arrasada por el fuego durante el incendio acaecido en Sierra Nevada en 2005 en Lanjarón). Los detalles de dichas zonas se encuentran recogidos en la Tabla M.1. En cada uno de los tres lugares se delimitaron tres parcelas en las cuales se llevaron a cabo las tareas de forestación (AZC, AZL) y reforestación (NPF). Para ello, en cada una de ellas se habilitaron diez líneas rectas disponiendo diez árboles por línea, alternando los plantones inoculados y control debidamente marcados (ver Figura III.1). Transcurridos 18 y 21 meses desde la repoblación (junio y septiembre del año 2015), se realizó un seguimiento visual de la supervivencia de los plantones en cada uno de los sitios en estudio.

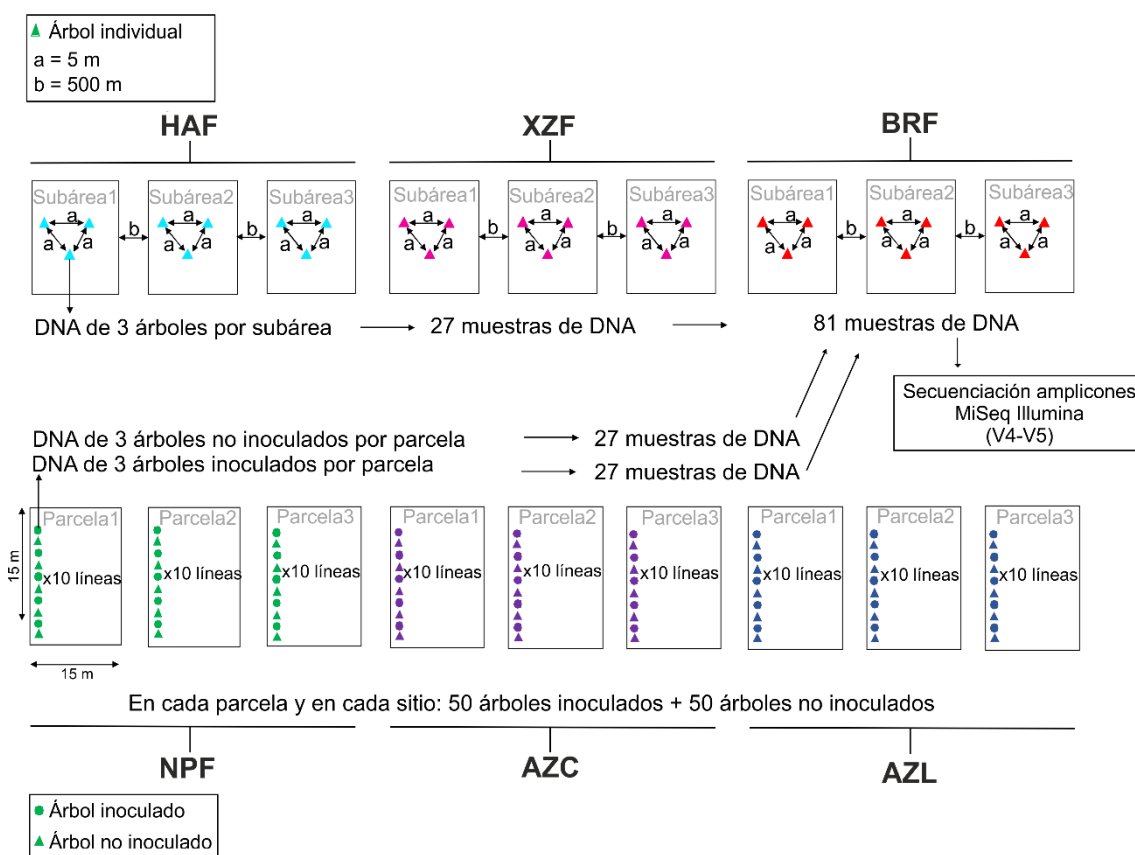


Figura III.1. Esquema del diseño experimental y procesamiento de muestras hasta la secuenciación masiva (Illumina) de las regiones hipervariables V4-V5 del gen *rrs*.

En la primavera del año 2015 (18 meses tras el trasplante) se procedió a la toma de muestras de suelo rizoférico y bajo la influencia de las raíces de plantones inoculados y no inoculados. Concretamente, se tomaron muestras de suelo de tres árboles inoculados y tres considerados control. De esta forma se obtuvo un total de 54 muestras. A dichos robles se les consideró como *robles de repoblación reciente*.

Paralelamente, se recuperaron muestras de suelo rizoférico de robles de mayor edad, no procedentes de tareas de repoblación reciente (denominados *robles naturales* de aquí en adelante). Concretamente, se muestrearon exactamente los tres mismos árboles que fueron analizados dos años antes (2013) en cada una de las tres subáreas de HAF (robledal maduro), BRF (robles de menos de 20 años de edad) y XZF, donde se localizaban pies sueltos de *Q. pyrenaica* de no más de 50 años en el momento del muestreo (Capítulo II). En este caso, al tratarse de robles nunca inoculados, se obtuvo un total de 27 muestras de suelo.

Tanto en el caso de los robles de repoblación como en el caso de los robles naturales, parte del suelo obtenido fue destinado al análisis de las propiedades físicoquímicas del mismo, mezclando en este caso el suelo correspondiente a los tres árboles procedentes de la misma parcela, y obteniendo por tanto una mezcla compuesta por cada una de ellas. La fracción restante de suelo fue procesada hasta la obtención del DNA rizosférico siguiendo la metodología concreta descrita en el Apartado M.4.1.1. Una vez obtenido el DNA de alta calidad procedente de cada uno de los árboles muestreados, se llevó a cabo la secuenciación de las regiones hipervariables V4-V5 del gen *rrs* mediante tecnología MiSeq (Illumina) empleando los *primers* y las condiciones descritas en el Apartado M.4.7.2.2. En este caso, el DNA molde procedente de cada uno de los 81 árboles muestreados fue secuenciado de forma individualizada (Figura III.1).

Tras la obtención de las lecturas brutas, estas fueron procesadas bioinformáticamente siguiendo el procedimiento descrito en detalle en el Apartado M.5.1.2.2. Debe mencionarse que por problemas inherentes a la secuenciación masiva hubo de eliminarse del análisis una réplica dado el anormal bajo número de secuencias limpias registrado. Para mantener el diseño balanceado del experimento, subsecuentemente se eliminó la réplica de menor número de secuencias de calidad las muestras correspondientes a cada uno de los sitios y condiciones estudiadas, siendo por lo tanto el nivel de replicación definitivo de 8 réplicas por sitio y tratamiento. El procesamiento de las secuencias culminó con la obtención de la correspondiente tabla de OTUs que recoge el número de secuencias limpias registradas para cada uno de ellos en cada muestra, siendo estos colapsados a un mayor nivel de distancia en aquellos casos en los que se deseó analizar rangos taxonómicos más elevados.

El análisis ecológico de las comunidades procariotas supuso en primer lugar la obtención de las curvas de esfuerzo a nivel de OTU para cada una de las muestras. Para el cálculo de la cobertura de Good así como de los diferentes índices de diversidad α se procedió a la realización de una rarefacción de los datos, reteniendo de forma aleatoria para cada muestra un número de secuencias equivalente al correspondiente a la muestra de menor tamaño. La comparación de los índices α mediante métodos estadísticos univariantes (paramétricos o no paramétricos según el tipo de distribución y la homogeneidad de la varianza de cada variable) fue uno de los primeros pasos hacia el estudio de las posibles diferencias entre plantones inoculados y no inoculados. Además, dichas comparaciones fueron también realizadas entre las muestras correspondientes a los robles de repoblación y aquellas correspondientes a los robles naturales.

Resultados

El abordaje desarrollado prosiguió con el estudio de la diversidad β de las comunidades procariotas de la rizosfera. Para ello, se emplearon todas las secuencias de calidad que componían las 72 muestras, sin realizar rarefacción alguna. Todos los análisis que aluden al estudio de la diversidad β fueron realizados en base a la métrica de distancia Weighted UniFrac. Así pues, se trató de responder a las cuestiones ecológicas inicialmente planteadas mediante los test estadísticos de análisis multivariante PERMDISP2 y PERMANOVA, estudiando por tanto la homogeneidad de la dispersión y las diferencias en los centroides de los grupos de muestras en función de los niveles de los factores en estudio, respectivamente. Concretamente, se analizó el efecto de varios factores sobre la composición y estructura de las comunidades procariotas. Para responder a la pregunta sobre las posibles diferencias asociadas a la introducción de inoculantes, se tuvieron en cuenta tan solo las muestras correspondientes a las áreas NPF, AZC y AZL, considerando el factor *tratamiento* y sus dos niveles (inoculado y control). Por otro lado, se evaluó si las comunidades rizosféricas de robles de repoblación reciente se aproximaban a aquellas de robles naturales, ya consolidados. En este caso, al objeto de mantener el diseño balanceado del experimento, tan solo fueron tenidas en cuenta las muestras correspondientes a los plantones control. Adicionalmente se analizaron las posibles diferencias existentes entre las comunidades procariotas de la rizosfera de los robles situados en los diferentes sitios, considerando por un lado los robles naturales y por otro los de repoblación reciente. Así pues, se analizó el efecto del factor *sitio* con tres niveles en cada caso. Debe puntualizarse que tras la realización de todas las comparativas posibles, en aquellos casos en los que el test permutacional PERMANOVA resultó significativo, se realizaron comparaciones dos a dos de las muestras conforme se detalla en el Apartado M.5.4.5., al objeto de identificar aquellas parejas de muestras entre las que residían las mencionadas diferencias.

Para estudiar la posible existencia de gradientes en la composición y estructura de las comunidades procariotas debidos a los parámetros fisicoquímicos del suelo, se llevó a cabo un análisis interpretativo de tipo CAP, seguido de la correspondiente validación estadística mediante una variante permutacional de ANOVA (Apartado M.5.4.3.4.3.). En este caso debe remarcarse que el análisis fue realizado al nivel taxonómico de género, excluyendo los datos de secuenciación masiva referentes al área BRF por carecer del registro de los parámetros edáficos de esta zona. Además, ante la ausencia de datos fisicoquímicos correspondientes al suelo bajo la influencia de las raíces de cada árbol individualizado, fue preciso calcular la abundancia relativa media de cada género en la rizosfera de los tres árboles procedentes de la misma subárea, para cada tratamiento. En definitiva, el nivel de replicación en los sitios naturales equivalió a tres réplicas y a seis en las zonas NPF, AZC y AZL (tres correspondientes a los robles inoculados, y tres a los controles). La significación del modelo así como la de cada uno de los parámetros fisicoquímicos incluidos en el mismo fue evaluada mediante el mencionado test similar a ANOVA.

Una vez identificados los factores edáficos que pueden determinar la estructura y composición de las comunidades procariotas rizosféricas, se llevó a cabo un estudio del impacto de los mismos sobre la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos. Para ello, se buscó la existencia de correlaciones entre cada uno de los factores fisicoquímicos que resultaron significativos según el análisis CAP, y la

abundancia relativa de aquellos géneros detectados en una abundancia igual o superior al 0.1% en el conjunto total de muestras. A tal fin se aplicó el test de correlaciones de Spearman (Apartado M.9.4.). Debe remarcarse que al objeto de reducir la complejidad del análisis, se excluyeron todos los géneros no identificados taxonómicamente (*unclassified*). Todas aquellas correlaciones estadísticamente significativas con un valor de ρ de Spearman ≤ -0.6 y ≥ 0.6 fueron consideradas fuertemente negativas y positivas, respectivamente.

Seguidamente se procedió al análisis de los perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas. Dichos análisis fueron realizados en base a la abundancia relativa de los diferentes taxones, considerando inicialmente las comunidades procariotas en su totalidad, y haciendo hincapié posteriormente en los géneros *Bradyrhizobium* y *Arthrobacter*, al objeto de estudiar de forma aproximada la presencia del consorcio introducido. Así pues, se comparó la abundancia relativa de cada uno de los taxones en los diferentes sitios, prestando especial atención a las diferencias existentes entre los árboles inoculados y aquellos no tratados. Para la realización de dichas comparaciones se emplearon test estadísticos de naturaleza no paramétrica (Apartado M.9.3.).

En última instancia, se procedió a la inferencia sobre las funciones desempeñadas por cada OTU a partir de su adscripción taxonómica, para lo cual se empleó la herramienta FAPROTAX (Apartado M.5.4.7.).

III.3. Resultados

III.3.1. Seguimiento de la supervivencia de los plantones en campo

Transcurridos 18 y 21 meses desde el trasplante de los robles del vivero a campo, se cuantificó el número de individuos vivos correspondientes a cada tratamiento en cada una de las parcelas en estudio. Tal y como puede apreciarse en la Tabla III.1, destaca el elevado porcentaje de plantones vivos (independientemente del tratamiento considerado), en el pinar naturalizado, observándose una tendencia opuesta especialmente en AZC tras 21 meses del trasplante.

Tabla III.1. Supervivencia de los plantones de *Q. pyrenaica* inoculados y no inoculados tras 18 y 21 meses en campo. Se indica la cantidad promedio de individuos vivos en todas las subáreas \pm desviación estándar, encontrándose los valores expresados porcentualmente.

Área	Tratamiento	18 meses (junio 2015)	21 meses (septiembre 2015)
NPF	Inoculado	70.00 \pm 13.37	66.00 \pm 14.97
	No inoculado	72.67 \pm 22.65	70.00 \pm 22.45
AZC	Inoculado	14.00 \pm 4.32	0.67 \pm 0.94
	No inoculado	10.00 \pm 5.66	1.33 \pm 1.89
AZL	Inoculado	25.00 \pm 15.46	19.00 \pm 13.43
	No inoculado	11.50 \pm 10.18	7.50 \pm 9.27

III.3.2. Propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de las raíces

El suelo correspondiente a todas las áreas de muestreo fue de tipo franco-arenoso a excepción del suelo del robledal maduro ubicado en HAF, el cual fue de tipo franco. Si bien algunas propiedades fisicoquímicas eran diferentes en función del área considerada, debe destacarse que entre el suelo bajo la influencia de las raíces de robles inoculados y robles sin inocular no se detectó parámetro alguno para el cual hubiera diferencias estadísticamente significativas (Tabla III.2).

El suelo franco de HAF mostró un contenido en arcilla significativamente superior a aquel bajo la influencia de las raíces de los plantones inoculados y no inoculados del área NPF, siendo prácticamente dos veces superior en ambos casos (test HSD de Tukey, p-valores < 0.018). Por el contrario, el suelo de la zona HAF resultó significativamente más arenoso y limoso que el correspondiente a la zona de expansión altitudinal XZF (test HSD de Tukey, p-valores < 0.016). El pH de la mayoría de los sitios se encontró próximo a la neutralidad, siendo el mayor valor detectado de aproximadamente 6.7 unidades (zona HAF), y el más ácido aquel registrado en el pinar naturalizado (NPF), con un valor de 5.7. Cabe destacar, que independientemente del modo en el que el pH fue medido (en H₂O o en KCl), los sitios HAF y NPF resultaron significativamente diferentes en cuanto a este parámetro (test HSD de Tukey, p-valores < 0.004). Por otro lado cabe destacar que fue precisamente el suelo bajo la influencia radicular de los plantones no inoculados trasplantados en NPF, aquel que mostró mayor contenido en materia orgánica, siendo el valor aquí registrado aproximadamente dos veces superior (y de forma estadísticamente significativa), a los propios de los árboles ubicados en AZL (inoculados y control) y en XZF (test HSD de Tukey, p-valores < 0.032). Destaca el bajo contenido en materia orgánica del suelo obtenido en los sitios AZL y XZF.

Capítulo III

Tabla III.2. Propiedades fisicoquímicas del suelo bajo la influencia de las raíces de los individuos de *Q. pyrenaica* localizados en las diferentes áreas de estudio. Para cada parámetro se especifica el valor promedio de las tres réplicas (correspondientes a cada una de las tres subáreas) \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre sitios (test ANOVA seguido de contraste *post-hoc* HSD de Tukey; test Kruskal-Wallis seguido de contraste *post-hoc* de Dunn y ajuste de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples, a un nivel de confianza del 95% en todos los casos). En el caso del área BRF no se dispone de datos fisicoquímicos del suelo bajo la influencia de las raíces para este periodo de muestreo.

Parámetro	HAF	XZF	NPF		AZC		AZL	
			Inoculado	No inoculado	Inoculado	No inoculado	Inoculado	No inoculado
Tipo de suelo	Franco	Franco-arenoso	Franco-arenoso	Franco-arenoso	Franco-arenoso	Franco-arenoso	Franco-arenoso	Franco-arenoso
Arena (%)	13.18 \pm 0.66 a	9.02 \pm 1.11 ab	7.77 \pm 0.51 b	7.20 \pm 0.22 b	11.83 \pm 2.48 ab	11.47 \pm 3.36 ab	10.43 \pm 0.51 ab	10.38 \pm 1.50 ab
Limo (%)	42.95 \pm 6.07 b	60.71 \pm 4.77 a	52.69 \pm 5.11 ab	51.46 \pm 4.99 ab	53.00 \pm 6.22 ab	53.49 \pm 5.56 ab	55.68 \pm 1.83 ab	53.81 \pm 2.23 ab
Arcilla (%)	43.87 \pm 5.60 a	30.27 \pm 4.44 b	38.54 \pm 6.25 ab	41.4 \pm 4.88 ab	35.16 \pm 3.74 ab	34.96 \pm 2.13 ab	33.89 \pm 1.32 ab	35.81 \pm 1.25 ab
Agua disponible (%)	13.97 \pm 2.95 ab	10.07 \pm 2.08 b	12.36 \pm 0.96 ab	11.83 \pm 0.63 ab	14.73 \pm 0.89 a	13.92 \pm 1.38 ab	13.53 \pm 1.07 ab	14.59 \pm 0.52 a
pH (H₂O)	6.67 \pm 0.42 a	6.23 \pm 0.25 ab	5.73 \pm 0.15 b	5.73 \pm 0.06 b	6.07 \pm 0.15 ab	6.13 \pm 0.23 ab	6.20 \pm 0.20 ab	6.27 \pm 0.12 ab
pH (KCl)	6.13 \pm 0.29 a	5.83 \pm 0.32 ab	5.07 \pm 0.20 bc	5.03 \pm 0.06 c	5.60 \pm 0.17 abc	5.67 \pm 0.31 abc	5.50 \pm 0.17 abc	5.57 \pm 0.47 abc
MOS^a (%)	6.30 \pm 1.33 ab	4.24 \pm 2.04 b	6.93 \pm 0.86 ab	8.17 \pm 1.93 a	5.36 \pm 0.36 ab	5.54 \pm 1.43 ab	3.45 \pm 0.18 b	3.94 \pm 1.01 b
N total (%)	0.30 \pm 0.04 a	0.24 \pm 0.10 a	0.19 \pm 0.03 a	0.21 \pm 0.03 a	0.25 \pm 0.06 a	0.23 \pm 0.04 a	0.17 \pm 0.03 a	0.19 \pm 0.02 a
Ratio C:N	11.89 \pm 1.60 ab	10.17 \pm 0.58 a	21.17 \pm 1.80 b	22.44 \pm 1.60 ab	12.73 \pm 2.94 ab	13.27 \pm 3.70 ab	11.61 \pm 1.57 ab	11.83 \pm 1.83 ab
Salinidad (mS/cm)	0.19 \pm 0.06 a	0.13 \pm 0.01 a	0.10 \pm 0.01 a	0.10 \pm 0.01 a	0.09 \pm 0.01 a	0.09 \pm 0.02 a	0.11 \pm 0.03 a	0.12 \pm 0.01 a
P asimilable (mg/kg)	26.67 \pm 3.22 a	16.33 \pm 6.81 a	23 \pm 6.08 a	25.33 \pm 7.02 a	11.33 \pm 2.52 a	10.67 \pm 2.08 a	14.67 \pm 1.16 a	19.00 \pm 6.56 a
K asimilable (mg/kg)	408.33 \pm 45.09 a	273 \pm 111.97 a	161.33 \pm 5.77 a	168 \pm 20.79 a	140.00 \pm 10.58 a	125.33 \pm 29.48 a	126.00 \pm 29.05 a	132.33 \pm 36.91 a

^a MOS, Materia Orgánica del Suelo

III.3.3 Características generales de los datos de secuenciación masiva y diversidad alfa (α)

La secuenciación de las regiones hipervariables V4-V5 correspondientes a los amplicones del gen *rrs* supuso la obtención de un total de 3,811,431 secuencias brutas, que tras ser procesadas y aplicado el filtro adicional propuesto por Bokulich y colaboradores (2013), resultó en la obtención de 1,810,414 secuencias de alta calidad. En la Tabla III.3 se indica en detalle el número de secuencias brutas y de calidad obtenido para cada uno de los sitios y tratamientos en estudio.

La tendencia de las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (distancia genética del 3%) fue asintótica, tal y como se aprecia en las Figuras III.2 y III.3. Para la mayoría de los casos, independientemente del sitio de muestreo o tratamiento considerado, las curvas prácticamente alcanzaron el *plateau*. Asimismo, los valores promedio del índice de cobertura de Good registrados se encontraban comprendidos entre el 98 y 99% aproximadamente, quedando así demostrado el suficiente esfuerzo de muestreo realizado.

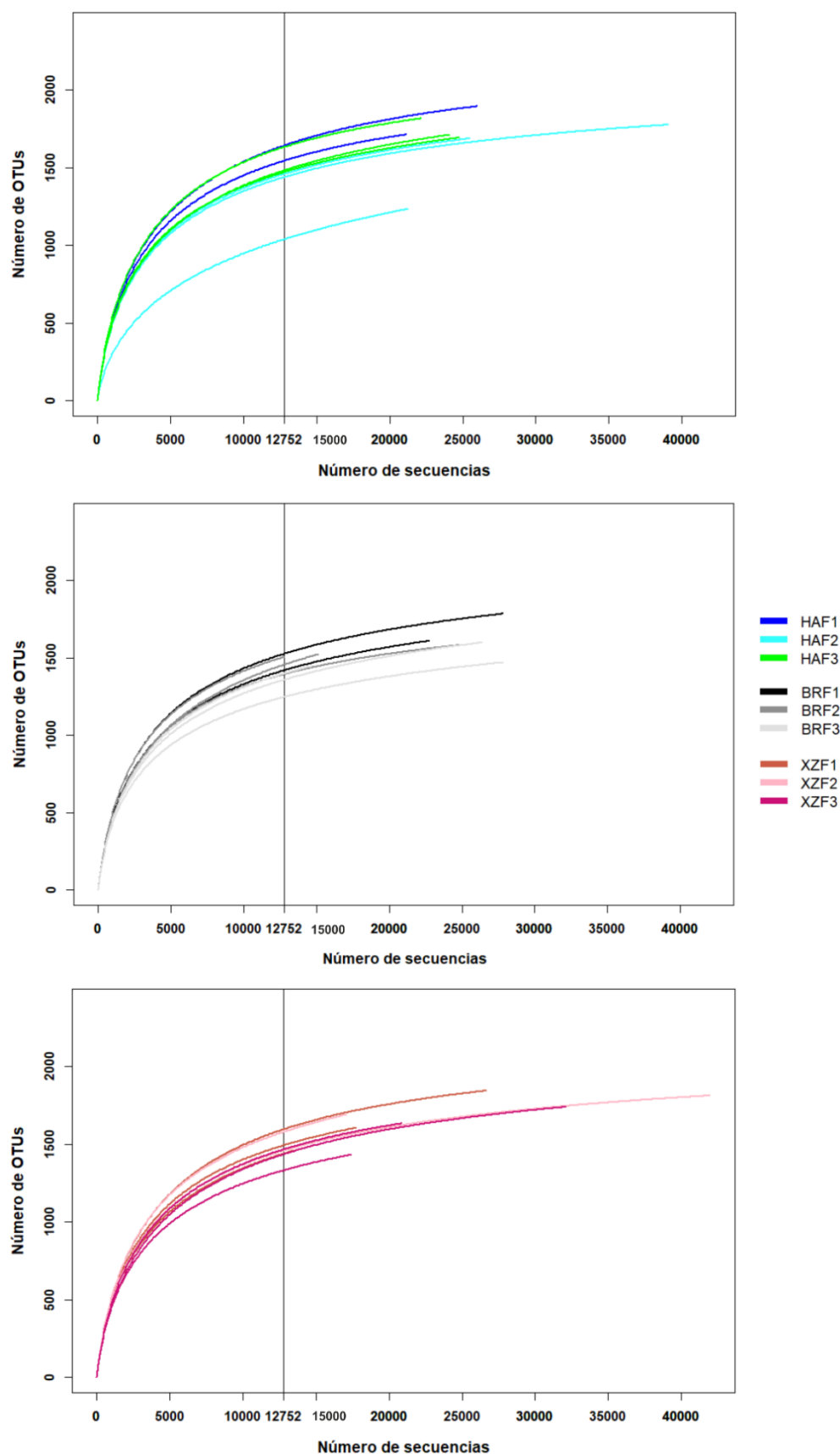


Figura III.2. Curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (3% distancia genética), para las muestras correspondientes a los robles naturales (HAF, BRF, XZF). La línea vertical ($x = 12,752$) indica el tamaño muestral más pequeño del conjunto total de muestras, el cual fue seleccionado para realizar la rarefacción de las muestras y calcular los índices de diversidad α .

Resultados

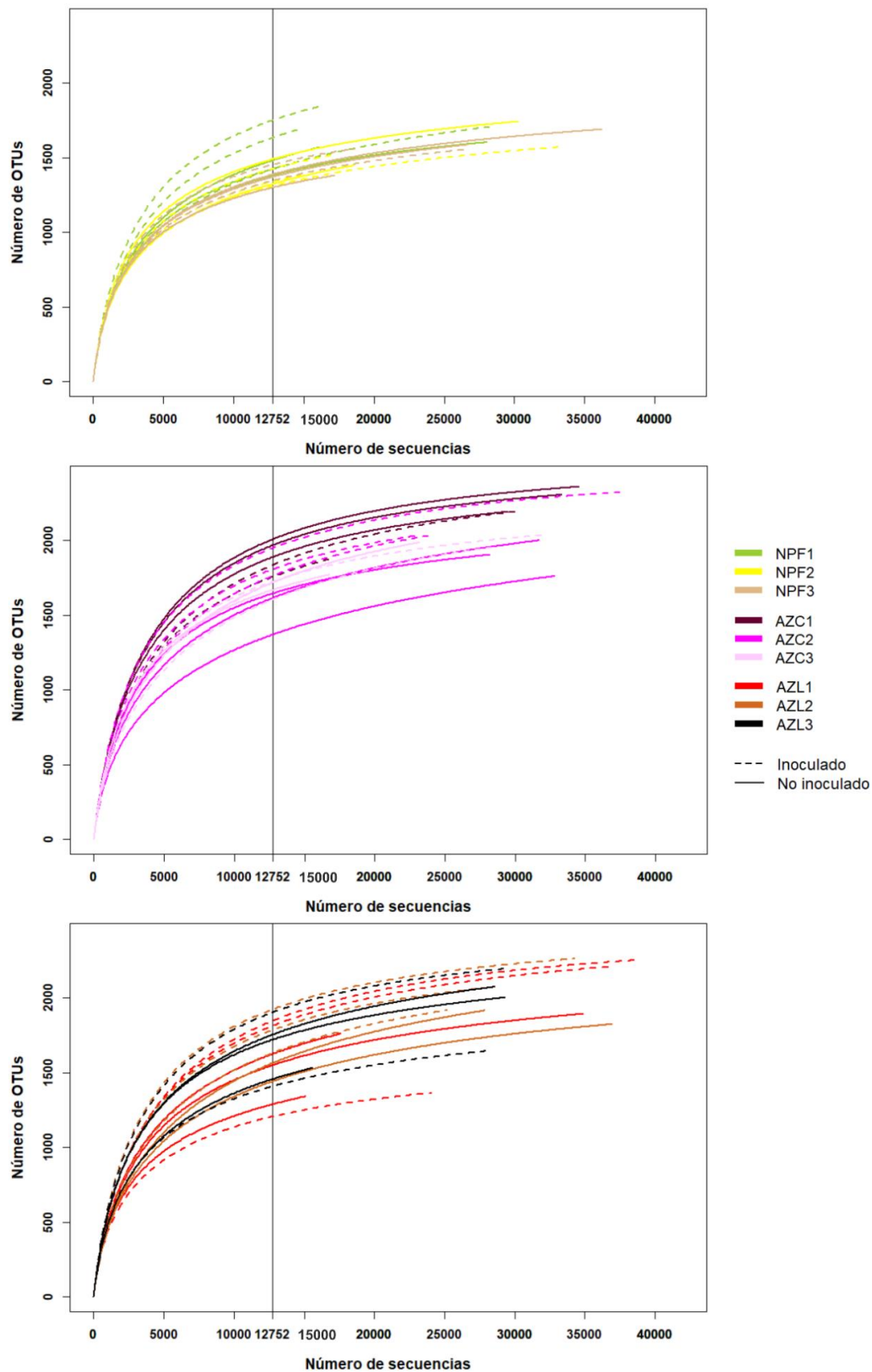


Figura III.3. Curvas de rarefacción obtenidas a nivel de OTU (3% distancia genética), para las muestras correspondientes a los sitios de repoblación forestal (NPF, AZC, AZL). La línea vertical ($x = 12,752$) indica el tamaño muestral más pequeño del conjunto total de muestras, el cual fue seleccionado para realizar la rarefacción de las muestras y calcular los índices de diversidad α .

Para evitar los sesgos debidos al diferente tamaño muestral, los índices de diversidad α fueron calculados tras la realización de una rarefacción al tamaño de

muestra más pequeño (12,752 secuencias, correspondiente a la muestra obtenida para el árbol 2 localizado en la subárea 3 del sitio de muestreo BRF). Cabe destacar que en todos los sitios y tratamientos analizados, las comunidades procariotas de la rizosfera de los robles mostraron una gran diversidad, reflejada en los valores del índice de Shannon superiores a 6 en todos los casos, así como en los altos valores del Inverso de Simpson (Tabla III.3). Asimismo, en todas las áreas de muestreo y para las dos condiciones estudiadas, la riqueza estimada (medida con el índice Chao-1) resultó considerablemente elevada, si bien el número de OTUs esperados depende del área considerada (Tabla III.3). Los valores próximos a la unidad para los índices de Pielou revelaron la equidad de las comunidades procariotas en todos los casos.

Resultados

Tabla III.3. Resumen de los parámetros de calidad de la secuenciación masiva (Illumina) e índices de diversidad α calculados para las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. En el caso del número de secuencias brutas y de calidad, se muestra la suma de todas las secuencias obtenidas para cada área o tratamiento. Todos los índices de diversidad α fueron calculados a un nivel de distancia genética del 3% y tras realizar la rarefacción de las muestras a 12,752 secuencias. Se indican los valores promedio obtenidos para las ocho réplicas de cada condición en estudio \pm desviaciones estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre áreas o tratamientos (test ANOVA seguido de contraste *post-hoc* HSD de Tukey; test Kruskal-Wallis seguido de contraste *post-hoc* de Dunn, aplicando la corrección de los p-valores de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples). El nivel de confianza considerado para todos los test estadísticos fue del 95%. *I*, Inoculado; *N.I.*, No Inoculado.

Área	Trat ^a .	Nº secuencias brutas	Nº secuencias de calidad	Cobertura de Good (%)	Nº OTUs observados	Chao-1	Shannon (H')	Inverso Simpson (1/D)	Pielou (J') ^b
HAF		475,602	203,875	98.74 \pm 0.34	1369.12 \pm 186.28 bc	1587.05 \pm 193.18 bc	6.26 \pm 0.46 ab	254.92 \pm 90.4 ab	0.8673 \pm 0.0473 a
BRF		355,006	172,095	98.34 \pm 0.78	1296.38 \pm 77.32 c	1452.72 \pm 99.75 c	6.13 \pm 0.17 a	140.9 \pm 54.27 b	0.8558 \pm 0.0183 a
XZF		392,889	187,182	98.43 \pm 0.72	1364.75 \pm 93.35 bc	1558.93 \pm 123.5 c	6.25 \pm 0.16 ab	194.53 \pm 55.81 ab	0.8655 \pm 0.0165 a
NPF	I	339,331	170,545	98.39 \pm 0.66	1349.5 \pm 123.89 bc	1537.15 \pm 123.41 c	6.3 \pm 0.12 ab	216.93 \pm 27.76 ab	0.8738 \pm 0.0089 a
	N.I.	379,389	186,969	98.59 \pm 0.68	1293.5 \pm 70.81 c	1464.98 \pm 95.37 c	6.27 \pm 0.08 ab	223.81 \pm 37.23 ab	0.8758 \pm 0.0076 a
AZC	I	442,925	209,735	98.52 \pm 0.72	1651.62 \pm 117.68 a	1915.24 \pm 140.65 a	6.53 \pm 0.2 b	275.97 \pm 103.35 a	0.8818 \pm 0.0196 a
	N.I.	468,990	229,856	98.80 \pm 0.49	1637.75 \pm 210.37 a	1897.27 \pm 217.16 a	6.55 \pm 0.24 b	303.65 \pm 89.76 a	0.8857 \pm 0.0191 a
AZL	I	514,138	244,346	99.09 \pm 0.26	1596.25 \pm 252.84 ab	1853.61 \pm 302.97 ab	6.49 \pm 0.25 b	265.79 \pm 91.89 a	0.8809 \pm 0.0175 a
	N.I.	443,161	205,811	98.50 \pm 0.65	1443.12 \pm 167.59 abc	1663.68 \pm 212.09 abc	6.32 \pm 0.2 ab	208.24 \pm 46.87 ab	0.8695 \pm 0.0165 a

^a *Trat.*, Tratamiento

^b Los valores promedio y desviación estándar del índice de Pielou se especifican con más cifras decimales que el resto de índices para facilitar la interpretación de los datos.

Por otro lado, debe remarcarse que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ni en términos de riqueza ni de equidad entre las comunidades procariotas asociadas a árboles inoculados y no inoculados, en ninguno de los dos sitios forestados (AZC, AZL) ni en el pinar naturalizado (NPF).

Si bien en el caso de las comunidades rizosféricas relativas a los robles naturales (sitios HAF, BRF, XZF) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de ellas en cuanto a los índices de diversidad α se refiere, las comunidades correspondientes a los robles trasplantados en AZC (tanto en el caso de los inoculados como los no inoculados), resultaron significativamente más ricas que aquellas de los robles de NPF (test HSD de Tukey, p-valores < 0.050). En efecto, las comunidades procariotas de los robles inoculados introducidos en AZC mostraron el mayor nivel de riqueza (observada y esperada, 1651 y 1915 OTUs respectivamente) de todas las poblaciones analizadas, incluso superior a la riqueza reportada en HAF, XZF y BRF.

III.3.4. Diversidad beta (β) de las comunidades procariotas

La diversidad existente entre las comunidades procariotas de la rizosfera de los robles ubicados en las diferentes áreas de estudio fue analizada tomando en consideración el conjunto de 1,810,414 secuencias de calidad, esto es, la totalidad de las secuencias sin rarificar. Esta fue además calculada a nivel de OTU (3% de distancia genética).

En primer lugar se analizaron las muestras correspondientes a los sitios de repoblación (NPF, AZC, AZL), apreciándose una alta multidimensionalidad de los datos, ya que para lograr explicar el 100% de la varianza de los mismos serían necesarias hasta 47 dimensiones. Teniendo en cuenta exclusivamente las dos primeras coordenadas del PCoA (43.8% de la varianza explicada, Figura III.4A), pudo apreciarse una considerable dispersión de los datos, especialmente en el caso de las muestras correspondientes a los robles ubicados en AZC. Pese a ello, la betadispersión o dispersión multivariante de este subconjunto de muestras resultó homogénea (test PERMDISP2, $F = 0.933$, p-valor = 0.478). Tal y como se puede apreciar en la Figura III.4A, en ninguno de los sitios analizados pudo verse una separación de las muestras en función del tratamiento de los plántones, encontrándose las muestras correspondientes a plántones inoculados y control igualmente distribuidas a lo largo de ambas coordenadas. El análisis PERMANOVA confirmó la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades procariotas de la rizosfera de robles inoculados y sin inocular (ver Tabla III.4). Por otro lado, tampoco se apreció un patrón claro de distribución de las muestras en base al área considerada, si bien aquellas relativas a NPF (tanto las correspondientes a plántones inoculados como no inoculados) quedaron ligeramente separadas de las de AZL en cuanto a la primera coordenada. Sin embargo, el análisis PERMANOVA reveló que la composición y estructura de las comunidades procariotas de cada uno de los sitios considerados son significativamente diferentes entre sí (Tabla III.4).

Contrastada la homeogeneidad en la estructura y composición de las comunidades procariotas de robles inoculados y control, se pasó a estudiar si las poblaciones que habitan en la rizosfera de robles de repoblación reciente se aproximan

Resultados

a las correspondientes a los robles naturales o ya consolidados. Para mantener un diseño balanceado del experimento, únicamente se incluyeron en el análisis las muestras correspondientes a robles control (no inoculados), además de las relativas a HAF, BRF y XZF (zonas naturales). Tal y como en el caso anterior, el subconjunto de muestras seleccionadas resultó altamente multidimensional, siendo necesarias 47 dimensiones para poder explicar la totalidad de la varianza de los datos, explicando un 39.4% de la misma con las dos primeras coordenadas (Figura III.4B). El análisis PERMDISP2 reveló que la dispersión de todos los grupos de muestras era homogénea ($F = 1.196$, $p\text{-valor} = 0.327$), aunque con tan solo las dos primeras coordenadas la variabilidad de los conjuntos de muestras relativas a AZC y AZL pareció mayor que en el resto de los casos (Figura III.4B). En el gráfico de ordenación correspondiente no fue posible observar un patrón claro de agrupación de las muestras en base a ninguna de las dos coordenadas, si bien pudieron apreciarse ciertos gradientes. Mientras que las comunidades procariotas de la rizosfera de los plantones de NPF aparentaron ser diferentes del resto de poblaciones según el primer eje, en el segundo pudo apreciarse cierta separación entre sí, especialmente de las muestras correspondientes a los robles naturales (Figura III.4B). En base a ninguna de las dos coordenadas estudiadas fue posible apreciar la separación de las muestras relativas a los robles de repoblación reciente respecto a aquellas de los árboles naturales. Dichos resultados fueron confirmados mediante análisis PERMANOVA, siendo significativamente diferente la estructura y composición de todas las comunidades procariotas entre sí (Tabla III.4).

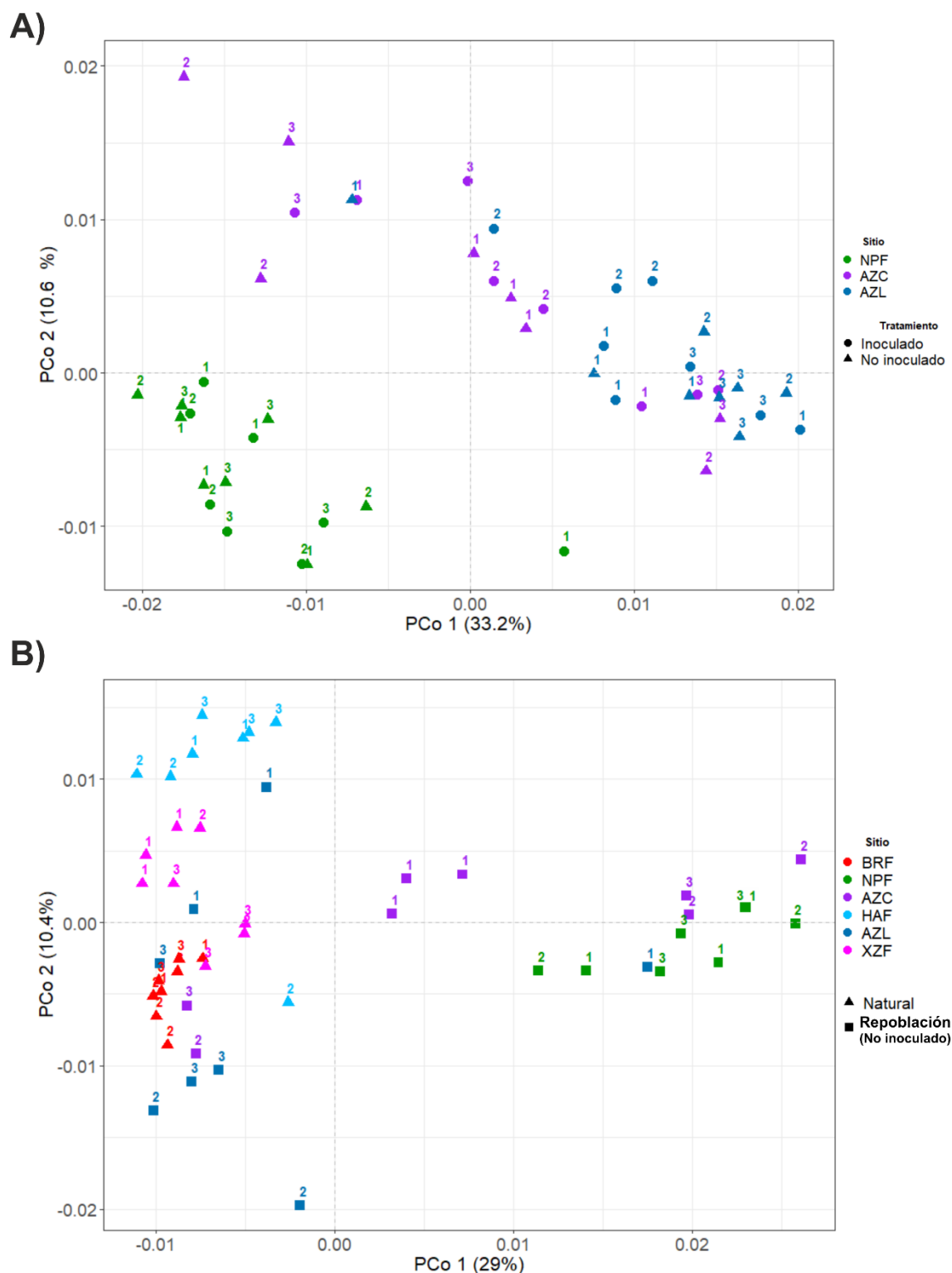


Figura III.4. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de robles de repoblación reciente (AZC, AZL, NPF) (A), y de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y de repoblación no inoculados (B). Los gráficos de ordenación fueron realizados a nivel de OTU (3% de distancia genética) y en base a la medida de distancia Weighted UniFrac. Los valores incluidos entre paréntesis indican el porcentaje de la varianza observada explicada por cada uno de los correspondientes ejes. Los números localizados encima de cada círculo o triángulo coloreado indican la parcela o subárea a la que corresponde cada muestra.

Resultados

Tabla III.4. Análisis PERMANOVA, y PERMANOVA por parejas de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica* considerando diferentes factores y grupos de muestras. El PERMANOVA por parejas fue llevado a cabo en aproximación a métodos de contraste de tipo *post-hoc* (ver detalles en el Apartado M.5.4.5.). En el caso de las comparaciones por parejas tan solo se indican aquellas que permiten responder a las principales preguntas planteadas en este capítulo. El nivel de confianza considerado para todos los test estadísticos fue del 95%.

Subconjunto de muestras y factor considerado	F	R ²	p-valor
Global			
Sitio_tratamiento ^a	4.913	0.384	10 ⁻⁴
Zonas (re)forestadas			
Tratamiento	4.031	0.324	10 ⁻⁴
Zonas (re)forestadas			
Sitio	8.916	0.283	10 ⁻⁴
Robles naturales			
Sitio	3.155	0.231	10 ⁻⁴
Zonas (re)forestadas (robles control)			
Sitio	4.768	0.312	2 · 10 ⁻⁴
Comparaciones por parejas			
	F	R ²	p-valor ^b
Zonas (re)forestadas			
NPF (Inoculados) vs. NPF (Control)	1.249	0.082	0.177
AZC (Inoculados) vs. AZC (Control)	0.719	0.049	0.621
AZL (Inoculados) vs. AZL (Control)	0.659	0.045	0.884
Zonas (re)forestadas			
NPF (Inoculados) vs. AZC (Inoculados)	5.097	0.267	0.002
NPF (Inoculados) vs. AZL (Inoculados)	7.300	0.343	0.002
AZC (Inoculados) vs. AZL (Inoculados)	2.245	0.138	0.011
NPF (Control) vs. AZC (Control)	4.307	0.235	0.002
NPF (Control) vs. AZL (Control)	9.614	0.407	0.002
AZC (Control) vs. AZL (Control)	2.658	0.160	0.024
Robles naturales			
HAF vs. BRF	4.677	0.250	0.003
HAF vs. XZF	2.269	0.139	0.004
BRF vs. AZC	2.620	0.158	0.003
Zonas (re)forestadas, robles control			
NPF vs. AZC	4.369	0.238	0.002
NPF vs. AZL	8.032	0.365	0.002
AZC vs. AZL	2.361	0.144	0.032

^a El factor *Sitio_tratamiento* fue creado artificialmente.

^b En este caso, los p-valores fueron corregidos mediante el ajuste Benjamini-Hochberg.

III.3.5. Relación entre la estructura de las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo y las propiedades fisicoquímicas del suelo

En una primera aproximación se llevó a cabo un análisis de constricción CAP incluyendo los parámetros edáficos como variables explicativas y la abundancia relativa promedio de los géneros procariotas en cada subárea o parcela como variable dependiente. Para ello inicialmente se descartaron del análisis las variables colineales

(VIF > 10), esto es, la textura, arena, arcilla, y la relación C:N. El modelo planteado incluyente de todas las variables restantes resultó estadísticamente significativo (test de permutación similar a ANOVA, p -valor = 10^{-4}), así como los siguientes factores edáficos: contenido en limo, agua disponible, pH (medido en solución acuosa y de KCl), MOS, contenido en N total y en K asimilable (test de permutación similar a ANOVA, p -valores < 0.037).

Así pues, el análisis canónico de coordenadas principales logró explicar un 39% de la varianza total observada (Figura III.5). Las muestras correspondientes al pinar naturalizado (NPF) quedaron separadas en el eje 1 del resto de muestras, encontrándose dicho eje fuertemente correlacionado y en sentido positivo con el contenido en materia orgánica del suelo, y en menor medida y en sentido opuesto con el pH (H_2O). En cuanto al eje menos explicativo de los dos, la abundancia relativa y relaciones filogenéticas de los diferentes géneros procarióticos se encontraban determinadas fundamentalmente por el contenido en agua y en potasio asimilable del suelo, encontrándose las muestras de la parcela 2 ubicadas en AZL y algunas de AZC claramente separadas de las correspondientes a HAF en base a ambos factores (Figura III.5).

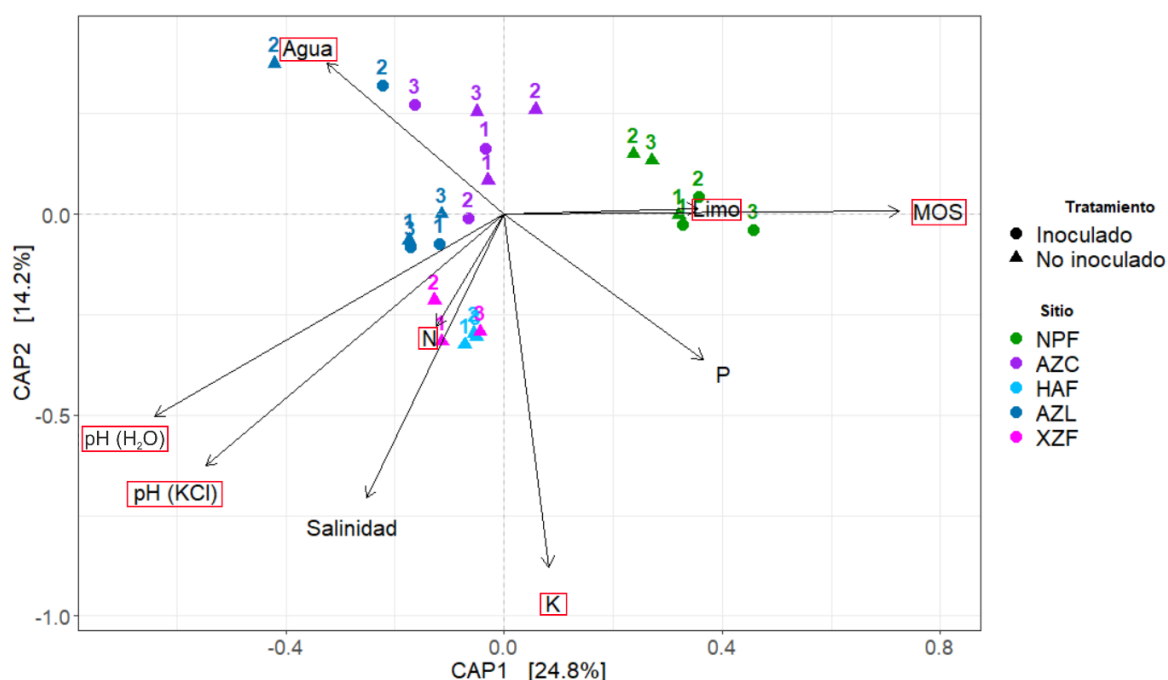


Figura III.5. Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP) de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. El análisis fue realizado a nivel de género y en base a la medida de distancia Weighted UniFrac, incluyendo en el modelo tan solo las variables de construcción no colineales (VIF < 10). Los valores incluidos entre corchetes indican el porcentaje de la varianza observada explicada por cada uno de los correspondientes ejes. Los parámetros fisicoquímicos que se encuentran dentro de un recuadro rojo son aquellos que resultaron estadísticamente significativos según el test de permutación similar a ANOVA, a un nivel de confianza del 95%. Los números localizados encima de cada círculo o triángulo coloreado indican la parcela o subárea a la que corresponde cada muestra. El nombre completo de los parámetros fisicoquímicos puede consultarse en la Tabla III.2.

Identificados aquellos factores edáficos con potencial impacto sobre la estructura y composición de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*, se estudió la existencia de correlaciones entre dichos factores y la abundancia relativa de

Resultados

los géneros mayoritarios. De todos aquellos géneros detectados en una abundancia relativa superior o igual a 0.1% en el conjunto total de muestras analizadas, 22 mostraron una correlación estadísticamente significativa y fuertemente positiva con el pH (medido en H₂O) del suelo rizosférico (test de correlación de Spearman, $\rho > 0.6$, p-valores < 0.002). Tal y como se puede apreciar en la Tabla III.5, destacan algunos géneros como *Aquabacterium*, *Blastochloris*, *Flavitalea*, *Herbaspirillum*, *Niastella* y *Telmatobacter* por la alta correlación entre su abundancia relativa y el pH, mientras que tan solo cinco se hallaban correlacionados con el contenido en materia orgánica del suelo.

Por el contrario, 15 y 17 géneros bacterianos se encontraban correlacionados de forma estadísticamente significativa y fuertemente negativa con el contenido en materia orgánica y el pH del suelo, respectivamente (test de correlación de Spearman, $\rho < -0.795$, p-valores < 0.001). Cabe destacar que algunos géneros mostraron correlaciones significativas y fuertemente negativas con varios parámetros fisicoquímicos del suelo (ver Tabla III.5), mientras que algunos como *Anaeromyxobacter*, *Spartobacteria*, *Lysobacter* y *Sphingobium* se encontraban simultáneamente correlacionados en sentido positivo y negativo con el pH y el contenido en materia orgánica, respectivamente.

Tabla III.5. Impacto de los factores fisicoquímicos del suelo bajo la fluencia de las raíces de *Q. pyrenaica* sobre la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos rizosféricos. Tan solo se indican los géneros mayoritarios (abundancia relativa $\geq 0.1\%$ en el conjunto total de muestras analizadas) que mostraron correlaciones estadísticamente significativas fuertemente positivas o negativas ($p \geq 0.6$, $p \leq -0.6$, respectivamente, test de correlaciones de Spearman), con los parámetros estadísticamente significativos según el análisis CAP. El nivel de confianza del test estadístico fue del 95%.

Género	Parámetro fisicoquímico ^a	Rho de Spearman (ρ)	p-valor
Correlaciones positivas			
<i>Acidovorax</i>	pH (H ₂ O)	0.642	0.001
<i>Anaeromyxobacter</i>	pH (H ₂ O)	0.737	$< 10^{-4}$
<i>Aquabacterium</i>	pH (H ₂ O)	0.919	$< 10^{-4}$
<i>Blastochloris</i>	pH (H ₂ O)	0.831	$< 10^{-4}$
<i>Bradyrhizobium</i>	pH (H ₂ O)	0.631	0.001
<i>Candidatus_Endomicrobium</i>	pH (H ₂ O)	0.638	0.001
<i>Flavitalea</i>	pH (H ₂ O)	0.840	$< 10^{-4}$
<i>Gp10</i>	pH (H ₂ O)	0.623	0.001
<i>Gp17</i>	pH (H ₂ O)	0.759	$< 10^{-4}$
<i>Herbaspirillum</i>	pH (H ₂ O)	0.885	$< 10^{-4}$
<i>Spartobacteria</i>	pH (H ₂ O)	0.616	0.001
<i>Lysobacter</i>	pH (H ₂ O)	0.704	10^{-4}
<i>Marmoricola</i>	pH (H ₂ O)	0.600	0.002
<i>Mesorhizobium</i>	pH (H ₂ O)	0.757	$< 10^{-4}$
<i>Niastella</i>	pH (H ₂ O)	0.8342	$< 10^{-4}$
<i>Nitrolancea</i>	pH (H ₂ O)	0.662	$4 \cdot 10^{-4}$
<i>Novosphingobium</i>	pH (H ₂ O)	0.715	10^{-4}
<i>Pirellula</i>	pH (H ₂ O)	0.745	$< 10^{-4}$
<i>Sphingobium</i>	pH (H ₂ O)	0.658	0.001
<i>Sphingomonas</i>	pH (H ₂ O)	0.602	0.002
<i>Telmatobacter</i>	pH (H ₂ O)	0.804	$< 10^{-4}$
<i>Vampirovibrio</i>	pH (H ₂ O)	0.682	$2 \cdot 10^{-4}$
<i>Aeromicrobium</i>	MOS	0.630	0.001
<i>Aminobacter</i>	MOS	0.611	0.002
<i>Bauldia</i>	MOS	0.694	$2 \cdot 10^{-4}$
<i>Gp15</i>	MOS	0.646	0.001
<i>Ramlibacter</i>	MOS	0.635	0.001
Correlaciones negativas			
<i>Chthonomonas/Armatimonadetes_gp3</i>	K asimilable	-0.751	$< 10^{-4}$
<i>Candidatus_Hydrogenedens</i>	K asimilable	-0.662	$4 \cdot 10^{-4}$
<i>Massilia</i>	K asimilable	-0.741	$< 10^{-4}$
<i>Hydrogenophaga</i>	N total	-0.631	0.001
<i>Aggregicoccus</i>	pH (H ₂ O)	-0.638	0.001
<i>Amorphus</i>	pH (H ₂ O)	-0.672	$3 \cdot 10^{-4}$
<i>Andersenella</i>	pH (H ₂ O)	-0.795	$< 10^{-4}$
<i>Arthrobacter</i>	pH (H ₂ O)	-0.689	$2 \cdot 10^{-4}$
<i>Bacillus</i>	pH (H ₂ O)	-0.766	$< 10^{-4}$
<i>Bauldia</i>	pH (H ₂ O)	-0.748	$< 10^{-4}$
<i>Chryseolinea</i>	pH (H ₂ O)	-0.623	0.001

Resultados

Género	Parámetro físicoquímico ^a	Rho de Spearman (ρ)	p-valor
<i>Dokdonella</i>	pH (H ₂ O)	-0.628	0.001
<i>Flavisolibacter</i>	pH (H ₂ O)	-0.725	10 ⁻⁴
<i>Lentzea</i>	pH (H ₂ O)	-0.703	10 ⁻⁴
<i>Luteolibacter</i>	pH (H ₂ O)	-0.650	6 · 10 ⁻⁴
<i>Microvirga</i>	pH (H ₂ O)	-0.632	9 · 10 ⁻⁴
<i>Mycobacterium</i>	pH (H ₂ O)	-0.713	10 ⁻⁴
<i>Parasegetibacter</i>	pH (H ₂ O)	-0.616	0.001
<i>Schlesneria</i>	pH (H ₂ O)	-0.617	0.001
<i>Sporichthya</i>	Limo	-0.725	10 ⁻⁴
<i>Adhaeribacter</i>	MOS	-0.622	0.001
<i>Anaeromyxobacter</i>	MOS	-0.618	0.001
<i>Blastocatella</i>	MOS	-0.702	10 ⁻⁴
<i>Chitinophaga</i>	MOS	-0.675	3 · 10 ⁻⁴
<i>Chryseobacterium</i>	MOS	-0.691	2 · 10 ⁻⁴
<i>Gemmatimonas</i>	MOS	-0.717	10 ⁻⁴
<i>Haliangium</i>	MOS	-0.618	0.001
<i>Candidatus_Hydrogenedens</i>	MOS	-0.685	2 · 10 ⁻⁴
<i>Spartobacteria</i>	MOS	-0.647	6 · 10 ⁻⁴
<i>Lysobacter</i>	MOS	-0.675	3 · 10 ⁻⁴
<i>Nitrolancea</i>	MOS	-0.693	2 · 10 ⁻⁴
<i>Porphyrobacter</i>	MOS	-0.786	< 10 ⁻⁴
<i>Reyranella</i>	MOS	-0.708	10 ⁻⁴
<i>Rhodanobacter</i>	MOS	-0.617	0.001
<i>Sideroxydans</i>	MOS	-0.628	0.001
<i>Sphingobium</i>	MOS	-0.675	3 · 10 ⁻⁴
<i>Sporichthya</i>	MOS	-0.641	7 · 10 ⁻⁴

^a MOS, Materia Orgánica del Suelo (%); K asimilable (mg/kg); *N total*, Contenido en N total (%); Limo (%)

III.3.6. Composición de las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*

La distribución de los diferentes taxones en las muestras en estudio fue analizada en base a la abundancia relativa de cada uno de ellos, y considerando diferentes rangos taxonómicos. Así, en todos los sitios fue posible detectar secuencias de hasta 24 *phyla* procarióticos conocidos, aunque la abundancia relativa promedio de solo nueve de ellos fue superior o igual al 1% en todos los sitios. Cabe mencionar que aunque la mayoría de los *phyla* pertenecían al dominio Bacteria, tres de ellos se encontraban adscritos al dominio Archaea: *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Pacearchaeota*, todos ellos detectados en una abundancia relativa inferior al 0.23% en cualquiera de los sitios y tratamientos considerados.

Entre los *phyla* identificados, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes* supusieron aproximadamente un 80% del total de secuencias en todos los sitios y condiciones estudiadas (Figura III.6). En línea con los

resultados del PCoA y de los análisis PERMANOVA, la abundancia relativa de ninguno de los *phyla* mayoritarios ($\geq 1\%$) resultó significativamente diferente en la rizosfera de robles inoculados y no inoculados en ninguna de las áreas de repoblación reciente. Por el contrario, y tal y como reveló la estructura general de la comunidad procariota (Apartado III.3.4.), pudieron apreciarse ciertas diferencias estadísticamente significativas tanto entre robles de los diferentes sitios de repoblación como entre robles naturales y robles no inoculados de los sitios (re)forestados, en cuanto a la abundancia relativa de los principales *phyla* rizosféricos se refiere (Figura III.6).

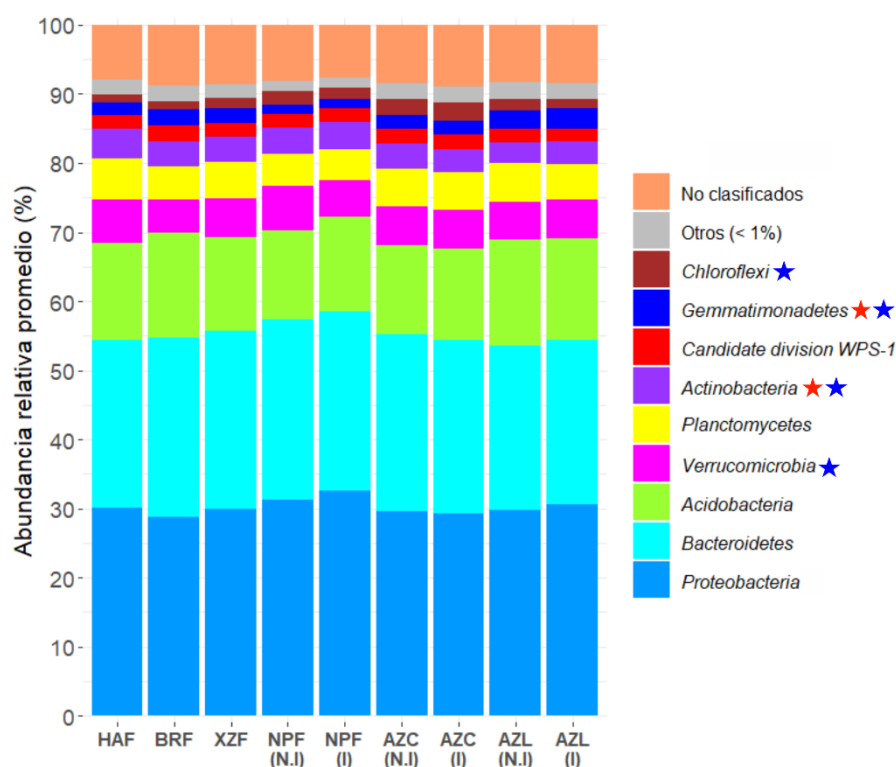


Figura III.6. Abundancia relativa promedio de los *phyla* mayoritarios que habitan la rizosfera de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y de repoblación reciente (NPF, AZC, AZL). N.I., No Inoculado; I., Inoculado. En el grupo artificial *Otros* (< 1%) se incluyen todos aquellos *phyla* representados por menos del 1% de las secuencias totales obtenidas. *No clasificados* hace referencia a aquellos *phyla* que no pudieron ser identificados con ningún otro presente en la base de datos empleada. Las estrellas rojas indican la existencia de diferencias significativas en la abundancia relativa promedio de los *phyla* correspondientes, entre plantones de repoblación (entre parejas de individuos inoculados y/o entre parejas de individuos no inoculados). Las estrellas azules indican la existencia de diferencias significativas en la abundancia relativa promedio de los géneros correspondientes, entre plantones de repoblación no inoculados y los robles localizados en los sitios naturales.

Entre los géneros predominantes identificados destacaron por su abundancia *Gp6* y *Gp4* (*Acidobacteria*), *Bradyrhizobium* (*Proteobacteria*), *Terrimonas*, *Ferruginibacter* y *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*), *Gemmatimonas* (*Gemmatimonadetes*), *Candidate division WPS-1*, y *Spartobacteria* y *Opitutus* (*Verrucomicrobia*), en función de la muestra considerada. Por otro lado, resultó considerable el elevado porcentaje de secuencias que no pudieron ser clasificadas a nivel de género (Figura III.7). De forma similar a lo apreciado a nivel de *phylum* y en consonancia con los resultados relativos a la diversidad β , no pudieron observarse diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la abundancia relativa de ninguno de los principales géneros de la rizosfera de robles inoculados y robles control,

Resultados

ni en NPF, AZC ni AZL (Figura III.7). Entre los diez géneros más abundantes, algunos se encontraron distribuidos de manera significativamente heterogénea en la rizosfera de los plantones de repoblación. Igualmente, la abundancia relativa de algunos de ellos resultó diferente significativamente si se compara la rizosfera de robles naturales y robles no inoculados.

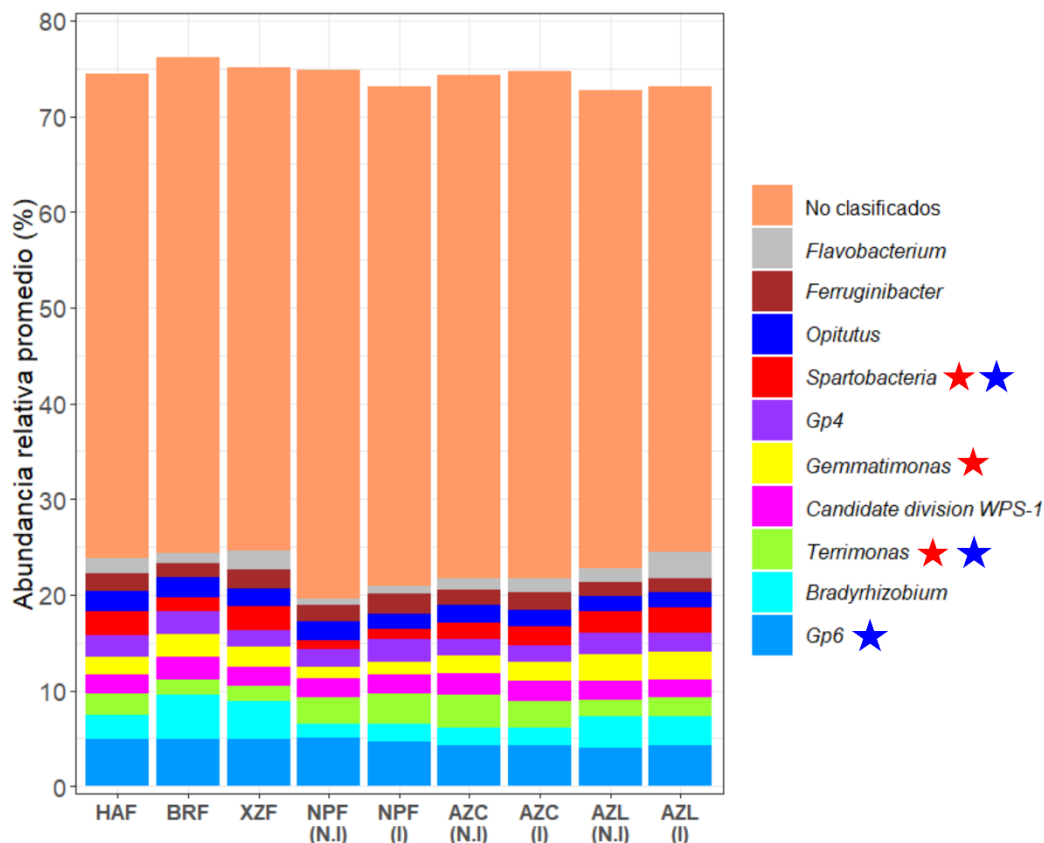


Figura III.7. Abundancia relativa promedio de los 10 géneros más abundantes que habitan la rizosfera de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y de repoblación reciente (NPF, AZC, AZL). N.I., No Inoculado; I., Inoculado. No clasificados hace referencia a aquellos géneros que no pudieron ser identificados con ningún otro presente en la base de datos empleada. Las estrellas rojas indican la existencia de diferencias significativas en la abundancia relativa promedio de los géneros correspondientes, entre plantones de repoblación (entre parejas de individuos inoculados y/o entre parejas de individuos no inoculados). Las estrellas azules indican la existencia de diferencias significativas en la abundancia relativa promedio de los géneros correspondientes, entre plantones de repoblación no inoculados y los robles localizados en los sitios naturales.

Tras aproximadamente un año y medio de los plantones en campo, se estudió la abundancia relativa de los géneros *Arthrobacter* y *Bradyrhizobium* (a los cuales se encontraban adscritas las cepas inoculadas en vivero) en las muestras correspondientes a las áreas de repoblación y en las relativas a los robles naturales. La proporción de secuencias promedio adscritas al género *Arthrobacter* fue considerablemente baja, no superando el 0.06% del total de secuencias en ninguno de los sitios analizados e incluso no siendo detectado en BRF ni XZF. Destaca la elevada dispersión de los datos, resultando dificultoso identificar diferencias significativas en la distribución de este taxón entre los robles inoculados y los controles negativos (Figura III.8). La disparidad en la proporción de secuencias correspondientes a este género en un mismo sitio o tratamiento condujo a semejante dispersión de los datos, no llegando a detectarse en algunas muestras (e.g., árbol 2 no inoculado de la parcela 3 de NPF)

mientras que en otras su abundancia relativa llegó hasta el 0.07% (e.g., árbol 2 no inoculado de la parcela 1 de NPF).

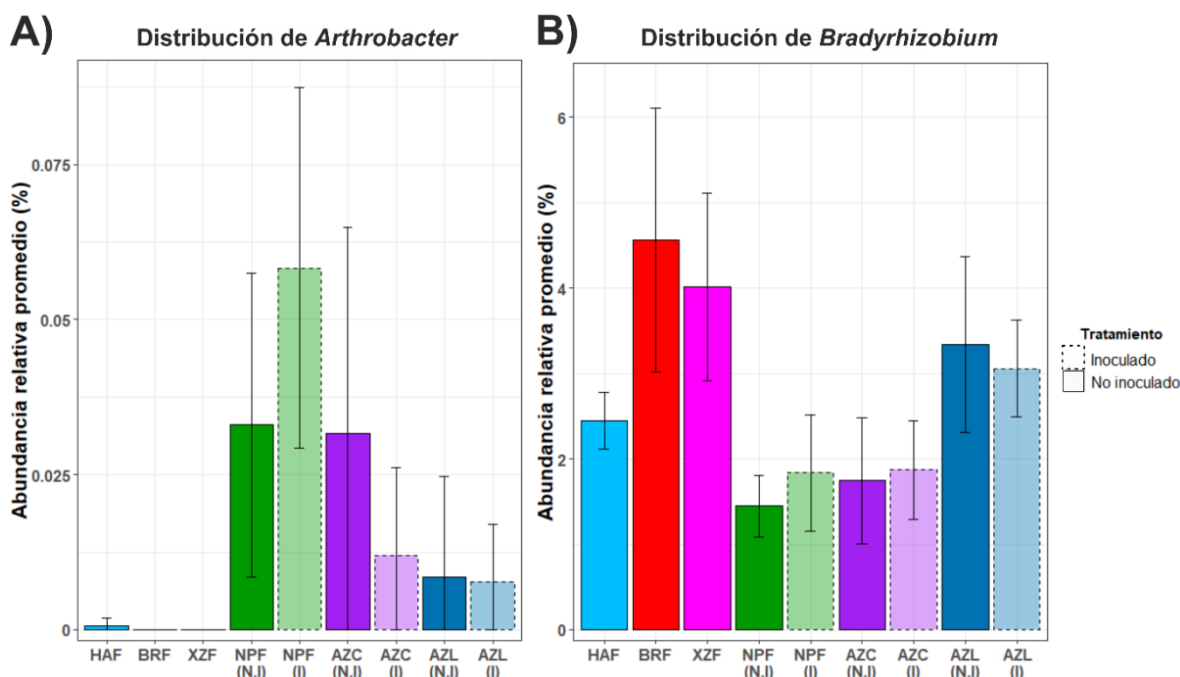


Figura III.8. Distribución de los géneros *Arthrobacter* (A) y *Bradyrhizobium* (B) en la rizosfera de robles naturales (HAF, BRF, XZF) y robles de repoblación (NPF, AZC, AZL). N.I., No Inoculado; I, Inoculado. Las líneas denotan la desviación estándar de la abundancia relativa registrada para cada género en cada condición.

En tanto, la abundancia relativa promedio del género *Bradyrhizobium* fue superior al 1.4% en NPF, AZC y AZL, tanto en el caso de los robles inoculados como en el de los controles negativos. Sin embargo, la abundancia relativa de este género en la rizosfera de los robles inoculados y no inoculados fue homogénea en cualquiera de los tres sitios, no detectándose diferencias significativas en ninguno de los casos. Tampoco pudieron detectarse diferencias significativas con respecto a la abundancia de este género en la rizosfera de los robles naturales (test de Kruskal-Wallis, p-valores > 0.072).

III.3.7. Predicción de las funciones llevadas a cabo por las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*

La inferencia funcional de las comunidades procariotas que habitan la rizosfera de los robles fue realizada en base a los perfiles taxonómicos de las mismas mediante el empleo de la herramienta FAPROTAX. Del total de OTUs que componen las muestras, tan solo a un 13% se le pudo asignar al menos una de las funciones incluidas en la base de datos de FAPROTAX, detectándose un total de 33 grupos funcionales en el conjunto total de los datos. Debe mencionarse que algunos OTUs poseían varias funciones asociadas, llegando a asignarse hasta 15 funciones distintas al OTU 002746 (género *Rhodoplanes*).

En líneas generales se pudo apreciar un alto grado de conservación funcional: 25 de las 33 funciones detectadas fueron registradas en todas las muestras, entre las que se encuentran la quimioheterotrofia (aerobia o no), fijación de N₂, reducción de nitrato o fermentación. Del total de funciones asignadas, diez fueron detectadas en una

Resultados

proporción superior o igual al 0.5% en al menos una de las áreas o tratamientos estudiados (Tabla III.6), entre las que destacan algunas generales como la mencionada quimioheterotrofia, y otras más específicas. Asimismo, entre las funciones mayoritarias se pudieron apreciar varias relacionadas con el metabolismo del N (fijación de N_2 , reducción de nitrato, ureolisis, nitrificación, oxidación aerobia del nitrito y respiración del nitrito y N).

Capítulo III

Tabla III.6. Proporción de las funciones inferidas para las comunidades procariotas de la rizosfera de *Q. pyrenaica* en zonas naturales y de repoblación. N.I., No Inoculado; I, Inoculado. Los datos expresan porcentualmente la proporción promedio de cada función en las tres parcelas de cada sitio \pm desviación estándar. Se detallan aquellas funciones detectadas en una proporción promedio superior o igual al 0.5% en al menos unos de los sitios o tratamientos, agrupándose todas las restantes en el grupo artificial *Otras funciones asignadas*. La categoría *Funciones no asignadas* alude a todas aquellas funciones descritas en la base de datos para las cuales no se encontraron correspondencias con ninguno de los OTUs de las comunidades procariotas en estudio.

Género ^a	Función	HAF	BRF	XZF	NPF		AZC		AZL	
					N.I	I	N.I	I	N.I	I
56	Quimioheterotrofia ^β	11.83 \pm 0.65	11.85 \pm 1.04	13.53 \pm 1.45	9.65 \pm 2.7	11.27 \pm 1.58	10.8 \pm 1.2	11.1 \pm 1.18	11.25 \pm 1.23	12.08 \pm 2.17
51	Quimioheterotrofia aerobia ^{α,β}	9.89 \pm 0.65	10.06 \pm 1.03	11.83 \pm 1.59	7.82 \pm 2.05	9.75 \pm 1.79	9 \pm 1.35	9.36 \pm 1.12	9.8 \pm 1.1	10.63 \pm 2.16
B, H	Fijación de N ₂ ^{α,β}	2.05 \pm 0.35	3.7 \pm 1.43	3.21 \pm 1.01	1.24 \pm 0.37	1.52 \pm 0.65	1.47 \pm 0.73	1.59 \pm 0.57	2.82 \pm 1.03	2.56 \pm 0.57
Sch, Rh, O	Reducción de NO ₃ ^{α,β}	2.32 \pm 0.99	1.74 \pm 0.25	1.65 \pm 0.31	1.87 \pm 0.36	1.62 \pm 0.26	1.69 \pm 0.39	1.56 \pm 0.24	1.32 \pm 0.36	1.32 \pm 0.24
Rhx, Sp, A, O	Fermentación	1.87 \pm 0.56	1.67 \pm 0.23	1.56 \pm 0.35	1.89 \pm 0.38	1.55 \pm 0.26	1.74 \pm 0.48	1.62 \pm 0.21	1.41 \pm 0.3	1.41 \pm 0.24
S, Am, M, D, H, Ma, R, Th	Ureolisis ^{α,β}	0.82 \pm 0.3	0.93 \pm 0.2	1.01 \pm 0.27	1.22 \pm 0.17	1.11 \pm 0.18	1.02 \pm 0.28	0.9 \pm 0.25	0.84 \pm 0.15	0.99 \pm 0.2
Npm, Nph, Nsp, Np	Nitrificación ^β	0.68 \pm 0.29	0.35 \pm 0.13	0.69 \pm 0.42	0.47 \pm 0.09	0.52 \pm 0.1	0.66 \pm 0.13	0.65 \pm 0.15	0.76 \pm 0.48	0.53 \pm 0.19
Np	Oxidación aerobia de NO ₂ ^α	0.56 \pm 0.25	0.25 \pm 0.11	0.54 \pm 0.33	0.31 \pm 0.06	0.35 \pm 0.08	0.42 \pm 0.12	0.38 \pm 0.09	0.54 \pm 0.43	0.27 \pm 0.13
Sch, Rh	Respiración de NO ₃ ^α	0.52 \pm 1.26	0.1 \pm 0.06	0.12 \pm 0.1	0.21 \pm 0.08	0.24 \pm 0.1	0.13 \pm 0.09	0.12 \pm 0.06	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.04
Sch, Rh	Respiración de N ^α	0.52 \pm 1.26	0.1 \pm 0.06	0.12 \pm 0.1	0.21 \pm 0.08	0.24 \pm 0.1	0.13 \pm 0.09	0.12 \pm 0.06	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.04
	Otras funciones asignadas	0.88 \pm 0.75	1.27 \pm 1.29	1.33 \pm 1.64	1.01 \pm 0.66	1.25 \pm 1.35	1.21 \pm 0.68	1.3 \pm 0.98	1.04 \pm 0	1.23 \pm 0.93
	Funciones no asignadas	31.04 \pm 6.58	30.76 \pm 4.55	34.27 \pm 5.91	24.9 \pm 3.02	28.17 \pm 5.1	27.06 \pm 4.84	27.39 \pm 3.92	28.81 \pm 0	29.88 \pm 5.97

^a En el caso de la quimioheterotrofia (aerobia o no) se indica el número de géneros distintos a los que pertenecen los OTUs a los que se les asignó dicha función. Para el resto de funciones, se especifican los géneros concretos. B, *Bradyrhizobium*; H, *Herbaspirillum*; Sch, *Schlesneria*; Rh, *Rhodoplanes*; O, *Opitutus*; Rhx, *Rhodoferax*; Sp, *Spirochaeta*; A, *Alterococcus*; S, *Singulisphaera*; Am, *Aminobacter*; M, *Mesorhizobium*; D, *Duganella*; Ma, *Massilia*; R, *Rhizobacter*; Th, *Thermomonas*; Npm, *Nitrosopumilus*; Nph, *Nitrososphaera*; Nsp, *Nitrosospira*; Np, *Nitrospira*.

^α Existencia de diferencias significativas en la proporción de la función correspondiente, entre plantones de repoblación (entre parejas de individuos inoculados y/o entre parejas de individuos no inoculados).

^β Existencia de diferencias significativas en la proporción de la función correspondiente, entre plantones de repoblación no inoculados y los robles localizados en los sitios naturales.

La mencionada conservación funcional fue especialmente observada en el caso de los plantones de repoblación, no detectándose diferencias significativas en la proporción de ninguna de las funciones mayoritarias ($\geq 0.5\%$) entre los robles inoculados y no inoculados, (ni en NPF, AZC ni en AZL). En tanto, la proporción de algunas funciones resultó significativamente diferente en la rizosfera de los robles de repoblación, y en los robles naturales con respecto a los no tratados (ver Tabla III.6).

III.4. Discusión

En zonas como la cuenca mediterránea, las tareas de repoblación forestal son frecuentemente llevadas a cabo con objeto de acelerar la recuperación de zonas degradadas o afectadas por un incendio forestal, por ejemplo. Sin embargo, uno de los principales problemas inherentes a las forestaciones o reforestaciones en el área mediterránea es la elevada tasa de mortalidad temprana de los plantones que son trasplantados a campo (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004). En el presente trabajo, la repoblación con plantones de roble fue realizada siguiendo un método reduccionista, esto es, adaptando un proceso como es la inoculación bacteriana y subsiguiente trasplante a un ecosistema preexistente (Maghnia *et al.*, 2019). En el caso de AZL, previo a la realización de los trasplantes se llevó a cabo un desbroce, limpiando y eliminando la vegetación allí presente cuya parte aérea podía bien alcanzar hasta 2 m de altura. Aunque en AZC no se realizó ninguna tarea de desbroce o limpieza de la zona, los plantones fueron trasplantados directamente, siendo la vegetación naturalmente presente matorrales almohadillados de porte no superior a 50 cm (aproximadamente). Así pues, en ninguna de las áreas de estudio donde la supervivencia fue especialmente baja (AZL, AZC), los robles recién trasplantados contaban con plantas nodrizas próximas que los protegiera de las duras condiciones ambientales, especialmente en verano. Cabe destacar que otros autores han demostrado el efecto positivo del trasplante de individuos de roble melojo bajo matorrales en diferentes áreas de Sierra Nevada, entre las que se encuentra Lanjarón (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004). Los citados autores documentaron la mayor supervivencia de los plantones de roble melojo cuando estos eran trasplantados junto con plantas nodrizas. Al parecer, estas redujeron el impacto sobre los robles jóvenes de las altas temperaturas del estío y de la alta radicación solar en zonas abiertas como las aquí estudiadas (AZL, AZC), manteniendo una mayor humedad ambiental y del suelo. Así pues, en NPF el dosel de los pinos bajo el cual los plantones fueron transferidos podría haber desempeñado un papel clave en la protección de los mismos, actuando por tanto los pinos como planta nodriza y resultando en un considerable porcentaje de supervivencia de los plantones. En definitiva, los registros de supervivencia aquí obtenidos y los aportados por otros autores apuntan hacia la necesidad de mantener los matorrales o incluso incluir plantas nodrizas típicas de la zona en las tareas de repoblación forestal para aumentar la eficiencia de las mismas, especialmente en la zona mediterránea y para afrontar los meses de verano. Es decir, se recomienda llevar a cabo aproximaciones holísticas, adaptando el ecosistema a un proceso concreto como es el trasplante de árboles inoculados (Maghnia *et al.*, 2019).

Aunque los suelos sobre los que habitualmente se desarrollan los robles son de naturaleza ácida, los valores de pH aquí medidos en la mayoría de los casos se encontraban próximos a la neutralidad o eran ligeramente bajos. Los registros obtenidos

se encuentran en consonancia con aquellos documentados para las mismas zonas dos años antes (Capítulo II), y con los obtenidos por otros autores en algunas de las áreas de muestreo aquí analizadas (Cobo-Díaz *et al.*, 2017). Sin embargo, destaca el suelo relativamente ácido del área NPF, en comparación con el resto. Pese a tratarse del suelo bajo la influencia de las raíces de *Q. pyrenaica*, la acidez característica de NPF podría ser consecuencia de la presencia de pinos en esta área. En los bosques de coníferas es común que se produzca una acidificación del suelo donde se depositan las acículas, debido a la presencia de compuestos polifenólicos propios de la hojarasca que acidifican el suelo (Li *et al.*, 2014). El pH de las capas superficiales del suelo de los bosques de coníferas puede llegar a encontrarse en valores próximos a 3-4 unidades (Baldrian *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014), por lo que el pH registrado en NPF podría encontrarse marcado por las acículas y materia orgánica depositada en las capas más superficiales del mismo.

Por otro lado, pudo apreciarse que las comunidades procariotas rizosféricas en todos los sitios analizados fueron diferentes entre sí, destacando la influencia de ciertos parámetros edáficos sobre la estructura y composición de las mismas (Figura III.5). Uno de los principales factores determinantes de las diferencias en las poblaciones procariotas fue el contenido en materia orgánica del suelo. Así, este parámetro podría ser el origen de las diferencias observadas, a nivel de género, entre las comunidades rizosféricas de los árboles ubicados en NPF y AZL, siendo los valores más elevados los que conducirían a la estructuración de comunidades similares a las características de NPF, y lo opuesto en el caso de AZL. Por otro lado, independientemente de las propiedades edáficas que determinan la estructura de las poblaciones procariotas, múltiples resultados demostraron que las comunidades de la rizosfera de robles de repoblación reciente y de robles naturales son diferentes entre sí. Sin embargo, las poblaciones procariotas correspondientes a los robles de repoblación resultaron diferentes en función del área considerada, no pudiéndose observar en el PCoA (Figura III.4) la agrupación entre sí de las muestras correspondientes a NPF, AZC y AZL y el distanciamiento de las mismas de aquellas relativas a los robles naturales (HAF, BRF, XZF). Así pues, no es posible determinar si las comunidades procariotas de la rizosfera de robles de repoblación no se han establecido en campo tras un año y medio del trasplante de los árboles; esto es, si no tienden hacia la estructura típica de comunidades propias de robles naturales o ya establecidos. Por otro lado, podría pensarse que las propiedades inherentes a cada área (ambientales, historia del lugar, etc.) tienen un efecto superior a las propias plantas sobre las comunidades procariotas. Las diferencias observadas en la estructura y perfiles taxonómicos de las comunidades procariotas podrían ser fruto de los parámetros fisicoquímicos del suelo en el que habitan, ya que es sabido que el suelo tiene una profunda influencia en el ensamblaje de las comunidades microbianas. Sin embargo, diversas variables no controladas en este trabajo podrían ser responsables de tales diferencias. Tal y como revisaron Philippot y colaboradores (2013), las poblaciones microbianas pueden ser dependientes no solo del tipo de suelo, sino también de la localización donde la planta crece, así como de la especie vegetal, genotipo o incluso del cultivar. Por lo tanto, no sería de extrañar que las diferencias observadas entre las poblaciones analizadas se encontraran gobernadas por múltiples aspectos como los diferentes barrancos de los ríos en los que se hallan los robles, edad de los hospedadores, vegetación acompañante, tipo de

Resultados

formaciones forestales, etc., o por la interacción de varios de ellos, resultando por lo tanto en comunidades propias y específicas de cada hábitat.

Tal y como se ha mencionado, las únicas comunidades procariotas entre las que no se detectaron diferencias significativas de ningún tipo (ni en términos de diversidad α , ni en cuanto a los perfiles taxonómicos y abundancia relativa de los principales *phyla* y géneros, ni en cuanto a las funciones predichas) fueron aquellas correspondientes a la rizosfera de robles inoculados y control, en ninguno de los tres sitios de repoblación. Por ello, se sugiere que la inoculación con el consorcio bacteriano aquí estudiado tiene un efecto neutro sobre todos los parámetros ecológicos estudiados.

Otros estudios han revelado que la introducción de inoculantes bacterianos supone la alteración de la estructura de la comunidad bacteriana de la rizosfera de plantas como alfalfa (*Medicago sativa*) o pepino (*Cucumis sativus*), encontrándose ciertos taxones desplazados por otros que aumentaron su abundancia relativa (Schwieger y Tebbe, 2000; Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, debe destacarse que en ambos casos los cambios en la estructura de la población fueron constatados a las 14 semanas de la liberación de los inoculantes a campo, periodo de tiempo muy inferior al contemplado en el caso del roble melojo. Si bien en aquellos trabajos se analizaron hospedadores herbáceos, no puede descartarse que en un menor periodo de tiempo al analizado las comunidades procariotas de la rizosfera de individuos de *Q. pyrenaica* inoculados hubieran mostrado diferencias con aquellas relativas a robles no inoculados. En tanto, algunos estudios realizados con especies forestales como *Pseudotsuga menziesii* (abeto de Douglas o pino Oregón) revelan que cuatro años tras la inoculación de una cepa de la especie *Pseudomonas fluorescens* y trasplante a campo de los plantones, las comunidades procariotas y fúngicas de la rizosfera permanecen invariables respecto a los controles no inoculados (Heinonsalo *et al.*, 2004).

Tras un año y medio desde el trasplante de los robles procedentes de vivero, la diversidad, estructura, composición y potencial funcional de las comunidades procariotas de la rizosfera de árboles inoculados y no inoculados fueron los mismos. Dicha homogeneidad sugiere, por un lado, que las comunidades procariotas son resilientes a una perturbación como la introducción de inoculantes y por ende tienen la capacidad de reestablecerse hacia la misma comunidad que los árboles no inoculados. Por otro lado, bien podría darse el caso de que ni tan siquiera hubiera llegado a producirse ningún tipo de perturbación, como consecuencia, por ejemplo, de una baja persistencia de los inoculantes. La ausencia de datos correspondientes a las comunidades procariotas que habitan el suelo donde los robles control e inoculados fueron trasplantados dificulta discernir entre ambos tipos de situaciones. Algunos autores reconocen la diversidad de las comunidades microbianas como factor clave de la resistencia a las invasiones por otros microorganismos (Mallon *et al.*, 2015). Asimismo, se considera que la susceptibilidad de los ecosistemas del suelo a la introducción de microorganismos foráneos depende de la complejidad de los propios ecosistemas (Griffiths y Philippot, 2013). Cabe destacar que en general, la microbiota asociada a diferentes tipos de hospedadores (e.g., plantas, animales) se caracteriza por su tendencia a ser resistente y además resiliente, siendo capaz de recuperar la estructura inicial de la comunidad tras una perturbación externa o tras la introducción de nuevas especies (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Toju *et al.*, 2018). En el caso concreto

de las especies leñosas, un estudio en Sierra Nevada demuestra que las comunidades procariotas de la rizosfera de encinas se encuentran prácticamente restablecidas nueve años después de una alteración tan marcada como un incendio forestal de alta intensidad (Fernández-González *et al.*, comunicación personal). Teniendo en cuenta la sugerida resiliencia de las comunidades procariotas rizosféricas de la encina, en el caso de que el consorcio bacteriano hubiera persistido en la rizosfera de *Q. pyrenaica* durante el periodo en vivero, no sería de extrañar que la comunidad microbiana del suelo en el que los plantones fueron trasplantados fuera lo suficientemente diversa y compleja como para sobreponerse a una posible alteración de la misma ocasionada por el trasplante y la introducción de los inoculantes.

Por otro lado, las similitudes existentes entre las comunidades procariotas rizosféricas de árboles inoculados y no inoculados podrían ser consecuencia del largo periodo transcurrido desde el tratamiento bacteriano hasta el muestreo, siendo tentador el especular sobre una persistencia del consorcio bacteriano inferior a dos años. Frecuentemente las bacterias se caracterizan por su baja capacidad para persistir en el sistema radicular de las plantas, e incluso para mantener los niveles poblacionales a una alta concentración semanas después de su inoculación (Araújo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Frey-Klett y colaboradores (1997) documentaron que una cepa de la especie *Pseudomonas fluorescens* no fue capaz de sobrevivir más de 19 semanas tras su inoculación sobre plantones de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), pudiendo haberse dado una situación similar en el caso de roble melojo.

Algunos autores destacan que el efecto de la aplicación de bioinoculantes bacterianos en árboles como *Acacia senegal* sobre la diversidad de las comunidades procariotas de la capa superficial del suelo próxima al cuello de la raíz puede ser variable (Herrmann *et al.*, 2012). Así, los mencionados autores observaron que varios meses después de la inoculación, las comunidades asociadas a árboles inoculados y no inoculados resultaron significativamente diferentes en términos de diversidad, no siendo detectada ninguna diferencia transcurrido un periodo de tiempo más largo, sugiriendo por tanto la pérdida de las cepas inoculadas. Dichos resultados apoyan parcialmente las evidencias obtenidas en este trabajo ya que las comunidades procariotas de robles control e inoculados no mostraron diferencias, pero los géneros bacterianos a los que se encuentran adscritas las cepas inoculadas sí pudieron ser detectados en ambos casos. Por un lado, a la vista de la baja supervivencia de algunos inoculantes una vez liberados a campo, se podría especular sobre una corta persistencia del consorcio inoculado. A ello podría seguirle o acompañarle el reclutamiento de OTUs de ambos géneros bacterianos del suelo circundante en el que residen hacia la rizosfera de los plantones (tanto inoculados como no inoculados). Tal y como se ha mencionado anteriormente, *Bradyrhizobium* es un género frecuente en el suelo de diferentes tipos de bosques, habiéndose detectado en una abundancia relativa de aproximadamente 3% en el suelo suelto y la rizosfera de encinas localizadas en Lanjarón, valor próximo al reportado en el sitio AZL ubicado en la misma zona montañosa (Fernández-González, 2014). Por otro lado, en consonancia con los resultados obtenidos aquí para *Q. pyrenaica*, Fernández-González y colaboradores (comunicación personal) documentaron también la prácticamente indetectable presencia del género *Arthrobacter* en el suelo suelto y la rizosfera de encinas situadas en un área próxima a AZL. Así pues, la ubicuidad del género *Bradyrhizobium* en diversos ecosistemas forestales

Resultados

(VanInsberghe *et al.*, 2015) y una presencia similar de ambos géneros en zonas próximas a AZL podrían respaldar la idea de la atracción de individuos de dichos géneros desde el suelo suelto hacia la rizosfera de roble melojo, y posterior establecimiento de los mismos. Sin embargo, la ausencia de datos referentes a la estructura de las comunidades procariotas típicas del suelo suelto de cada zona de estudio imposibilita corroborar dicha teoría. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que por aspectos inherentes a las técnicas de secuenciación masiva y a las bases de datos empleadas, no fue ni tan siquiera posible conocer la especie de adscripción de los OTUs pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* y *Bradyrhizobium* que fueron detectados en este trabajo.

Asimismo, se plantea la posibilidad de que los inoculantes introducidos hubieran persistido y fueran capaces de colonizar la raíces y establecerse en campo, pudiendo incluso dispersarse hacia el hábitat rizosférico de los plantones no inoculados. Cabe destacar que previamente ha sido demostrado que una cepa del género *Bradyrhizobium* inoculada en árboles de la especie *Acacia mangium* es capaz de persistir hasta 42 meses después del trasplante a campo de los árboles inoculados, siendo capaz de diseminarse hacia las raíces de plantas vecinas no inoculadas (Galiana *et al.*, 1994). En la misma línea, Narožna y colaboradores (2015) documentaron la supervivencia de dos cepas de la especie *B. japonicum* en una parcela en la que fueron inoculadas 20 años antes sobre plantas de soja (*Glycine max*), y en la que no volvió a haber nunca cultivos. Además, los citados autores fueron capaces de detectar la presencia de ambas cepas a una distancia de hasta 40 m de donde las plantas fueron inicialmente cultivadas, denotando una marcada dispersión bacteriana. En el caso del roble melojo, la dispersión de las cepas del hábitat rizosférico de un árbol a otro adyacente podría verse favorecida por la gran prominencia del sistema radicular y la notable extensión de las raíces laterales de esta especie (Jiménez Sancho *et al.*, 1997; Castillo Marín y Castillo Marín, 2010), aunque además del contacto radicular entre árboles se requeriría para ello la movilidad de las cepas inoculadas.

En aparente controversia con los resultados obtenidos para roble melojo, Thompson y colaboradores (1990) informaron sobre la persistencia de 100 días de una cepa de la especie *Arthrobacter globiformis* al ser inoculada en la rizosfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum*), periodo muy inferior al considerado en este trabajo. Sin embargo, cabe destacar que tanto las condiciones experimentales de aquel trabajo como el holobionte en estudio distaban mucho de las correspondientes al estudio aquí realizado, siendo por tanto difícil inferir la posible supervivencia de la cepa inoculada sobre *Q. pyrenaica*. Además, la escasez de estudios en la literatura que abordan la persistencia de inoculantes basados en este género (especialmente en lo que a especies arbóreas se refiere) hace que sea difícil hipotetizar sobre su posible establecimiento una vez liberados a campo.

En otro orden de cosas, los resultados obtenidos revelaron que algunos géneros se encuentran positivamente correlacionados con el pH, como *Gp10* y *Gp17*, lo cual ha sido previamente observado por otros autores para dichos géneros (Jones *et al.*, 2009). Por el contrario, otros como *Arthrobacter* mostraron una correlación negativa con el mencionado parámetro edáfico. Dichos resultados contrastan con los obtenidos por Fernández-González y colaboradores (2017), quienes documentaron una mayor

abundancia de este género en la rizosfera de encinas a pH alcalino que en el caso de suelos más ácidos. Debe puntualizarse que en aquel caso el holobionte mencionado se encontró sujeto a un incendio forestal que supuso la alcalinización del suelo, pudiendo haber alterado más parámetros de los aquí considerados que determinarían la mayor abundancia de dicho género en suelos de pH alto. Por otro lado, algunos de los géneros más abundantes en la rizosfera de roble melojo como *Gemmatimonas* se encontraban negativamente correlacionados con el contenido en materia orgánica del suelo, lo cual se vio apoyado en la mayor abundancia relativa de este taxón precisamente en el suelo rizosférico de AZL, aquel con menor valor de este parámetro. Este mismo fenómeno ha sido observado también en la rizosfera de otras especies leñosas como encina y olivo (Fernández-González *et al.*, resultados sin publicar), quedando de manifiesto la preferencia o mayor abundancia de este género por suelos pobres en materia orgánica. En el mismo sentido, los géneros *Anaeromyxobacter* y *Lysobacter* se encontraban negativamente correlacionados con el contenido en MOS. Estos géneros se caracterizan por su naturaleza microdepredadora, habiéndose sugerido su importante papel en el recambio de la materia orgánica del suelo (Lueders *et al.*, 2006). Así, la lisis de sus presas bacterianas podría contribuir al descenso en el contenido en materia orgánica asociado al incremento en la abundancia relativa de dichos géneros microdepredadores.

Por otro lado, debe remarcarse que algunos de los géneros más abundantes en la rizosfera de roble melojo no se encontraron afectados por ninguno de los factores edáficos analizados. Uno de los más abundantes en todas las áreas estudiadas fue *Bradyrhizobium*, lo cual no resultó sorprendente dada su habitual presencia en la rizosfera de quercíneas como encina o incluso roble melojo (Cobo-Díaz *et al.*, 2015; Cobo-Díaz *et al.*, 2017; Fernández-González *et al.*, 2017), tal y como se ha mencionado anteriormente. A su vez, en 18 bosques distintos de Norte América, correspondientes a diferentes ecozonas y sujetos a distintas condiciones climáticas e historias sucesionales, este género ha sido en todos los casos el mayoritario del suelo (VanInsberghe *et al.*, 2015). Así, resulta tentativo justificar la ausencia de correlaciones entre la abundancia de *Bradyrhizobium* y los diferentes parámetros fisicoquímicos del suelo rizosférico en base a la ubicuidad que caracteriza a este género bacteriano.

La abundancia de este género en todos los sitios estudiados hizo que una de las principales funciones predichas en este hábitat fuera la fijación de N. Junto con esta función, otras tantas relacionadas con el metabolismo del N fueron las detectadas en mayor proporción en todas las muestras, poniendo de manifiesto la importante potencial contribución de las comunidades bacterianas de la rizosfera en el reciclado de este nutriente. Otras de las funciones mayoritarias en los hábitats estudiados fueron la nitrificación y oxidación aerobia del amonio, descritas previamente como dos de los principales procesos del ciclo del N llevados a cabo por bacterias en los ecosistemas forestales (Lladó *et al.*, 2017). Por otro lado, debe destacarse la redundancia funcional detectada en muchos casos, encontrándose OTUs taxonómicamente diversos asociados a una misma función. Algunos autores sugieren que la redundancia funcional podría incrementar la resiliencia de las comunidades procariotas a determinadas alteraciones (Allison y Martiny, 2008), por lo que la ausencia de especialización funcional aquí observada podría ser signo de comunidades procariotas resilientes.

Predecir las funciones llevadas a cabo por las comunidades procariotas a partir de la taxonomía es uno de los primeros pasos hacia el desciframiento del funcionamiento del hábitat en estudio. Sin embargo, debe tenerse en mente que las funciones son inferidas a partir de la afiliación taxonómica de los OTUs que componen las comunidades, y que la predicción de una función no necesariamente implica que esta se lleve a cabo en el hábitat o ecosistema en consideración. Además, diferentes cepas de una misma especie pueden mostrar un metabolismo diferencial como ciertas cepas no fijadoras de N₂ atmosférico del género *Bradyrhizobium* (VanInsberghe *et al.*, 2015), por lo que asignación de ciertas funciones a ciertos OTUs puede no ser del todo certera. En definitiva, los resultados correspondientes a la inferencia funcional deben tomarse con cautela y como una aproximación a las funciones desempeñadas por la comunidad procariota en el hábitat estudiado.

III.5. Perspectivas futuras

Si bien el diseño experimental planteado permitió concluir que las comunidades procariotas de la rizosfera de roble melojo son iguales en individuos inoculados y no inoculados tras 18 meses en campo, varios aspectos podrían ser abordados en un futuro con los que completar el estudio realizado. Así pues, la ausencia de diferencias entre las poblaciones procariotas de ambos tipos de árboles fue únicamente contrastada en términos de diversidad, estructura y composición de las mismas, si bien aspectos funcionales no fueron tenidos en cuenta. Mediante aproximaciones de tipo metaproteómico, metabolómico o incluso bioquímico (e.g., estudio de la actividad de enzimas extracelulares) podría alcanzarse una visión holística del efecto de la introducción de plantones inoculados, incluyendo el impacto sobre la funcionalidad del suelo. En este sentido, debe tenerse en cuenta que la herramienta FAPROTAX únicamente permite realizar una inferencia sobre las posibles funciones desempeñadas por las comunidades procariotas en base a la taxonomía de los individuos que las componen, por lo que sería necesario validar experimentalmente dichos hallazgos obtenidos.

En otro orden de cosas, debe mencionarse que con la técnica de secuenciación masiva y las bases de datos de taxonomía procariota disponibles es difícil conocer la especie de adscripción de los OTUs registrados, siendo el nivel de género el rango taxonómico más bajo determinado con fiabilidad. Por consiguiente, con la metodología y herramientas disponibles en la actualidad, no fue posible conocer si las cepas inoculadas se hallaban en las muestras analizadas. Sería por tanto recomendable implementar en un futuro otro tipo de alternativas con las que poder estudiar las comunidades – o parte de ellas – a un nivel taxonómico más profundo, como se indica a continuación. Siempre teniendo en cuenta que se trata de un Parque Nacional, donde no se pueden introducir especies modificadas genéticamente.

Por otro lado, la búsqueda de las cepas bacterianas inoculadas en estadíos más tempranos al considerado, por ejemplo en el vivero, permitiría tener una idea más certera de la supervivencia del consorcio, y determinar si incluso llega a campo. La presencia de las cepas inoculadas podría examinarse mediante qPCR, empleando para ello *primers* específicos con los que detectar las cepas concretas en estudio, o el rango taxonómico superior más próximo. Además de conocer la posible supervivencia del consorcio inoculado, el estudio de la comunidad microbiana del suelo donde los

plantones son transferidos permitiría conocer si se produce una alteración de la comunidad nativa o si esta es resiliente frente a la introducción de inoculantes bacterianos. Al mismo tiempo, sería posible determinar si las cepas *B. canariense* GV101 y *A. globiformis* AFG20.1 forman parte de la comunidad microbiana del suelo suelto en cada una de las áreas estudiadas.

Finalmente, en caso de ser descartada la ausencia de alteraciones de índole estructural, composicional y funcional de las comunidades procariotas nativas, sería conveniente testar el efecto protector de plantas nodrizas sobre plantones de roble melojo introducidos desde vivero a campo. Sin embargo, para ello deberían llevarse a cabo estudios pormenorizados considerando diferentes aspectos, como las especies vegetales más adecuadas a emplear.



CAPÍTULO IV

Aislamiento, estudio de la diversidad genotípica e identificación taxonómica de bacterias aisladas de la rizosfera y endosfera de raíz de *Quercus pyrenaica*

La imagen muestra las ramas de un individuo de *Quercus pyrenaica* y el matorral arbustivo de *Genista versicolor*.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

IV.1. Introducción

IV.1.1. Géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter*

Las bacterias que interaccionan con plantas forman parte de uno de los grupos de microorganismos más apreciados en la agricultura y silvicultura, tal y como se ha revisado anteriormente en detalle (Apartado 2.2.). En aquellos casos en los que se buscan PGPB o BCAs para mejorar el *fitness* de un hospedador vegetal que sufre algún tipo de amenaza – véase el caso de la especie leñosa *Q. pyrenaica* (Apartado 1.1.1.2.3.4.) –, resulta primordial el diagnóstico del problema y la identificación de los posibles bioinoculantes. Así, algunos autores remarcan la necesidad de caracterizar taxonómicamente los potenciales PGPB y BCAs (así como los microorganismos sobre los que ejercer el biocontrol) para su monitorización y futuras aplicaciones. La correcta identificación taxonómica de los mismos puede suponer importantes beneficios prácticos y económicos en el desarrollo de esta tecnología (Lyal *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2016).

La búsqueda y aislamiento de candidatos a PGPB y/o BCAs y los subsiguientes estudios taxonómicos de los mismos, han conducido a la identificación de múltiples especies bacterianas asociadas a plantas. Uno de los géneros habitualmente detectado en los nichos vegetales es *Pseudomonas*. Con frecuencia se considera que los miembros de este género son prometedores PGPB y/o BCAs dada su gran ubicuidad e inmensa plasticidad metabólica, lo cual les permite, entre otros aspectos, colonizar nichos ecológicos muy variados (Ramírez-Bahena *et al.* 2015). No solo su metabolismo es reconocido por su gran plasticidad, sino que la complejidad filogenética y el elevado número de especies adscritas a este género son también característicos (Peix *et al.*, 2018). Este género perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria* fue descrito a finales del siglo XIX (Migula, 1894), y desde entonces su taxonomía ha sufrido abundantes cambios, adscribiéndose numerosas nuevas especies al mismo. Así, aproximadamente un siglo tras la descripción del género este ya contaba con 102 especies reconocidas (Mulet *et al.*, 2010). Si bien el número de nuevas especies descritas anualmente durante los primeros años del siglo XXI puede considerarse moderado (entre 3 y 5), de 2009 a 2017 la lista de especies pertenecientes al género *Pseudomonas* fue engrosada en 70 adicionales, con una media de 10 especies nuevas descritas anualmente durante el periodo 2014-2017 (Peix *et al.*, 2018). En julio de 2019 la cantidad de especies válidamente incluidas en el género *Pseudomonas* asciende a 255 según la LPSN (Euzéby, 1997).

Así, la riqueza taxonómica del género *Pseudomonas* podría considerarse elevada. En la actualidad el género se compone de dos principales linajes: el correspondiente a *P. fluorescens* y el linaje de *P. aeruginosa* (Mulet *et al.*, 2010; Gomila *et al.*, 2015; García-Valdés y Lalucat, 2016). Según estos autores, el linaje '*P. fluorescens*' comprende seis grupos filogenéticos, concretamente '*P. fluorescens*' (el más amplio de todos), '*P. syringae*', '*P. lutea*', '*P. putida*', '*P. anguilliseptica*' y '*P. straminea*', cada uno de ellos comprendiendo a su vez por varios subgrupos. Sin embargo, Peix y colaboradores (2018) propusieron la definición de un nuevo grupo filogenético en este linaje, el grupo '*P. rhizosphaerae*'. El otro gran linaje ('*P. aeruginosa*') se compone de cinco grupos filogenéticos concretos: '*P. aeruginosa*', '*P. oleovorans*', '*P. oryzae*', '*P. stutzeri*' y '*P. luteola*'. Por otro lado, los estudios más

recientes sugieren la definición de un nuevo linaje, el linaje '*P. pertucinogena*' (Peix *et al.*, 2018), el cual contendría el consolidado grupo filogenético del mismo nombre previamente definido por García-Valdés y Lalucat (2016), compuesto por varias especies recientemente descritas. En definitiva, el elevado número de especies incluidas en el género *Pseudomonas* así como las relaciones filogenéticas entre las mismas pone de manifiesto la extrema complejidad filogenética del mismo.

Otro género bacteriano perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria* cuyos miembros interaccionan frecuentemente con plantas es *Luteibacter* (Johansen *et al.*, 2005; Akter y Huq, 2018). Este fue descrito por primera vez en el año 2005 por Johansen y colaboradores, y a diferencia de la gran cantidad de especies incluidas en el género *Pseudomonas*, en julio de 2019 *Luteibacter* cuenta tan solo con tres especies válidamente descritas y reconocidas: *L. anthropi*, *L. rhizovicius* y *L. yeojuensis*, según la LPSN (Euzéby, 1997). Debido a la relativamente reciente descripción del género y de forma totalmente opuesta a lo sucedido con *Pseudomonas*, pocos aspectos son conocidos del mismo. Así, ni tan siquiera se ha podido esclarecer la identidad de dos cepas que podrían pertenecer a nuevas especies del género. Por un lado, la hipotética nueva especie *L. jiangsuensis* propuesta por Wang y colaboradores (2011) permanece ocho años después sin validez taxonómica según la LPSN (Euzéby, 1997), considerándose su nombre inválido (Yoon *et al.*, 2017). Empero, otras propuestas de descripción de nuevas especies como la relativa a *L. pinisoli* realizada por Akter y Huq (2018) no han tenido ningún apoyo taxonómico. En este último caso no se ha incluido a fecha de escritura de esta Tesis la secuencia del gen *rrs* de la propuesta cepa tipo ni tan siquiera en bases de datos de este gen curadas como EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017). La reciente secuenciación del genoma de la sugerida cepa tipo *L. pinisoli* MAH-14 (Baltrus *et al.*, 2019) podría contribuir a esclarecer la situación taxonómica de la misma y por consiguiente la de la especie nueva propuesta. No obstante, se debe aún seguir aunando esfuerzos para caracterizar más en detalle la taxonomía y propiedades del género *Luteibacter*.

IV.1.2. Identificación de bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter*

Hasta aproximadamente finales del siglo XX, la inmensa mayoría de los trabajos relativos a la taxonomía de *Pseudomonas* se basaban exclusivamente en el análisis de la secuencia del gen *rrs*. Aunque se trata de una herramienta poderosa para realizar asignaciones taxonómicas a nivel de género, con tan solo la secuencia de este gen es difícil distinguir diferentes cepas de la misma especie, como sucede en el caso de *P. putida* (Yamamoto y Harayama, 1995). En ocasiones es tan bajo el poder resolutivo de la secuencia de este gen que no es posible discriminar de forma interespecífica en algunos grupos filogenéticos del género *Pseudomonas* (Peix *et al.*, 2018). El alto nivel de conservación del mismo conduce a que solo unas cuantas posiciones en su secuencia sean informativas. Además, en el caso de *Pseudomonas* la utilidad de este gen ha sido cuestionada debido a la heterogeneidad intraespecífica del mismo, dando lugar en numerosas ocasiones a la obtención de árboles filogenéticos con bajo soporte estadístico a nivel de especie (Tayeb *et al.*, 2005). A pesar de ello, el análisis de la secuencia del gen *rrs* resulta obligatorio en los casos de descripción de nuevas especies de este género (Tindall *et al.*, 2010).

Al igual que en el caso de los rizobios (Capítulo I), el análisis de genes *housekeeping* que codifican proteínas es una alternativa que permite superar las limitaciones inherentes al estudio del gen ribosomal. Así, en el caso del género *Pseudomonas*, durante la última década se han incluido ciertos genes en los estudios taxonómicos y filogenéticos de este género por resultar más informativos. Entre ellos destacan el gen *rpoD* que codifica el factor σ^{70} de la RNA polimerasa, el gen *gyrB* que codifica la subunidad β de la girasa, y el gen *rpoB* codificante de la subunidad β de la RNA polimerasa. Se trata de genes de excelentes características para la realización de estudios taxonómicos y filogenéticos dado que por lo general su nivel de expresión es elevado, se encuentran suficientemente conservados pero mantienen un suficiente nivel de variabilidad nucleotídica, y se hallan en copia única en el genoma de las especies del género *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2010). De todos ellos, se considera que el *rpoD* es el de mayor poder resolutivo seguido de *gyrB* y *rpoB*, habiéndose demostrado que este último tiene un poder de resolución tres veces superior al del gen *rrs* (Tayeb *et al.*, 2005). Estos autores apuntaban a que cuanto mayor sea el número de genes analizados, más probable es que la filogenia de este género sea fiable y estable. Sin embargo, en un trabajo más reciente Mulet y colaboradores (2010) recomiendan analizar en primer lugar el gen ribosomal (el cual permite conocer la localización filogenética de las cepas dentro del género) y continuar analizando el *rpoD* y *gyrB* para una mayor resolución. Tan solo en el caso de ciertos grupos filogenéticos (e.g., '*P. oryzae*', '*P. oleovorans*', '*P. asplenii*', '*P. koreensis*', '*P. fragi*') dichos autores consideran imprescindible el análisis del gen *rpoB* para lograr una mayor resolución. Debe destacarse que en la actualidad existe una tendencia cada vez mayor a analizar las relaciones evolutivas entre especies del género *Pseudomonas* en base a múltiples genes, esto es, mediante MLSA (*Multi-Locus Sequence Analysis*, análisis de la secuencia de múltiples *loci*). Ello es debido a que a través de MLSA es más probable determinar correctamente los patrones evolutivos entre especies ya que se analiza un mayor número de posiciones nucleotídicas (con respecto al análisis individualizado de uno de esos genes), mitigando en cierta medida los efectos de la transferencia horizontal génica sobre las inferencias evolutivas (Pascual *et al.*, 2010).

Por el contrario, en el caso del género *Luteibacter*, la delineación molecular de especies llevada a cabo hasta la fecha se ha encontrado sujeta exclusivamente al análisis de la secuencia del gen *rrs*. Tal y como se ha mencionado, el número de especies incluidas en este género es considerablemente pequeño y la distancia genética entre las mismas lo suficientemente elevada como para no haber sido propuesto el análisis de genes *housekeeping* para la delineación de especies.

IV.2. Diseño experimental

Una de las etapas principales en el desarrollo de un bioinoculante bacteriano es la búsqueda de los candidatos teóricamente más adecuados para el hospedador concreto o el hábitat en estudio. En este contexto, el aislamiento y subsiguiente caracterización genotípica y taxonómica de los mismos son dos aspectos cruciales en este proceso. Así pues, una vez descartadas las diferencias entre las comunidades procariotas rizosféricas de plantones inoculados y no inoculados con un consorcio bacteriano (Capítulo III), se pretendió aislar bacterias que forman parte de la comunidad procariota nativa asociada a la raíz de roble melojo. Para ello, atendiendo a los

Resultados

resultados obtenidos en el Capítulo II relativos a la composición del *core*-compartido de la rizosfera de dicha especie, se buscó aislar aquellos OTUs con ratio rRNA:rDNA superior o igual a dos dada su potencial actividad en dicho hábitat. En aras de optimizar la eficiencia del posible bioinoculante, se tuvo en cuenta que las hojas, corteza e incluso las raíces de diferentes especies del género *Quercus* son frecuentemente ricas en taninos, lo cual puede comprometer la supervivencia del bioinoculante dadas las propiedades antibacterianas de dichos compuestos fenólicos (Chowdhury *et al.*, 2004). Así, de los 157 OTUs del *core*-compartido con ratio superior o igual a dos, se tuvieron en consideración aquellos taxonómicamente clasificados que según la literatura científica son capaces de degradar compuestos fenólicos. En definitiva, en base a las premisas anteriores se pretendió obtener una colección de aislados rizosféricos de los géneros *Phenylobacterium* y *Pseudomonas*.

Los microorganismos que habitan la endosfera radicular de las plantas también forman parte de la microbiota asociada a las raíces, y en el caso específico de las quercíneas pocos trabajos se han centrado en su estudio. Por lo tanto, al objeto de tener representados varios nichos ecológicos relativos a la raíz de roble melojo, se pretendió obtener una colección de aislados bacterianos que habitaran en el interior de las mismas. En este caso, la ausencia de trabajos previos sobre la composición y estructura de la comunidad procariota endosférica de la especie *Q. pyrenaica* condujo al aislamiento no selectivo de las bacterias que residen en el interior de las raíces.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en otoño de 2014 se tomaron muestras de suelo rizosférico de tres árboles ubicados en la subárea 1 de HAF por tratarse de la localización donde *Phenylobacterium* y *Pseudomonas* eran más abundantes, según los resultados obtenidos en el Capítulo II. Por otro lado, dada la menor suberificación de las raíces de robles jóvenes en comparación con las de aquellos más adultos, durante la primavera de 2015 se descuajaron tres árboles inoculados y otros tres no inoculados en cada una de las parcelas habilitadas en NPF, zona donde la supervivencia de los plantones fue elevada (Capítulo III).

Para proceder al aislamiento bacteriano se llevó a cabo la metodología detallada en el Apartado M.6.3.2. Con el objetivo de aislar bacterias de la rizosfera de roble melojo pertenecientes a los géneros *Phenylobacterium* y *Pseudomonas*, se emplearon medios selectivos que incluían fuentes de carbono de naturaleza fenólica como agentes selectivos. Sin embargo, el aislamiento de las bacterias que habitan en la endosfera de las raíces fue realizado en los medios generales que se detallan en el Apartado M.6.2.

Con el objetivo de seleccionar tan solo los aislados pertenecientes a los géneros de interés y reducir a su vez el volumen de muestras con el que trabajar, se procedió a la identificación taxonómica de todos los aislados obtenidos en base a la secuencia parcial del gen *rrs* de los mismos (*primers* 9bfm y 1512uR). Para ello, se seleccionaron para el resto de análisis aquellas cepas correspondientes a los géneros de interés.

Una vez obtenidas sendas colecciones de bacterias de la rizosfera y endosfera radicular de *Q. pyrenaica* se estudió la diversidad genotípica de las mismas mediante análisis de los perfiles electroforéticos RAPD. Para ello, todos aquellos aislados que mostraron perfiles RAPD con un nivel superior al 70% del coeficiente de correlación de Pearson se consideró que pertenecían al mismo grupo. Una vez caracterizada la

diversidad genotípica de los aislados, se procedió a la identificación taxonómica de los mismos, para lo cual fue secuenciado completamente el gen *rrs* (primers 9bfm, 1512uR, Z4 y X11). En el caso de las cepas aisladas pertenecientes al género *Pseudomonas*, adicionalmente se amplificó y secuenció el gen *rpoD* para lograr una mayor resolución a nivel de especie. Finalmente, se estudiaron las relaciones filogenéticas entre las cepas de cada una de las colecciones bacterianas obtenidas y las cepas tipo de las especies más próximas. En el caso del género *Pseudomonas* se llevó a cabo un análisis filogenético basado en los genes *rrs* y *rpoD* concatenados. Debe puntualizarse que dado que en este Capítulo se analizó un número considerablemente inferior de cepas con respecto al Capítulo I de esta Tesis, y que las relaciones filogenéticas fueron inferidas en base a la concatenación de los dos genes en estudio, las secuencias no fueron agrupadas por Tipos. Por otro lado, en el caso de las cepas adscritas al género *Luteibacter*, únicamente fue analizado el gen ribosomal.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Aislamiento de bacterias asociadas a la raíz de *Q. pyrenaica* y genotipado mediante RAPD

Teniendo en cuenta todos los medios de cultivo empleados para la realización del aislamiento, se apreció el desarrollo de 406 y 30 colonias bacterianas en el caso de las muestras correspondientes a la rizosfera y endosfera radicular de roble melojo, respectivamente. De todas ellas se logró identificar a nivel de género la totalidad de los aislados procedentes del interior de la raíz y 93 correspondientes a la rizosfera de los robles ubicados en HAF, pertenecientes todos ellos a los 22 géneros que se indican en la Tabla IV.1. Cabe destacar que no fue posible identificar ninguna cepa adscrita al género *Phenylobacterium*, pero sí se lograron aislar 44 pertenecientes al género *Pseudomonas*. En el caso de la endosfera radicular, el género del cual se obtuvo una mayor representación fue *Luteibacter* (Tabla IV.1), por lo que todos los aislados pertenecientes a dicho género fueron seleccionados para el resto de análisis. En definitiva, tan solo se tuvieron en cuenta las colecciones de aislados de los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter*.

Resultados

Tabla IV.1. Número de aislados obtenidos de la rizosfera y del interior de la raíz de individuos de *Q. pyrenaica* localizados en HAF y NPF, respectivamente. Se indica el género de adscripción de cada uno de los aislados en base a la secuencia parcial del gen *rrs* y tras la comparación de las mismas con aquellas presentes en la base de datos GenBank® mediante la herramienta BLASTn. Para realizar la adscripción a cada género, se tuvieron en cuenta los resultados del mejor *hit* obtenido. *Inoculado* hace referencia a los robles inoculados ubicados en NPF de los que fueron obtenidos los aislados, y *No Inoculado* a aquellos no inoculados (controles negativos). Los guiones denotan que no fue detectado ningún aislado perteneciente al género concreto.

Género	Rizosfera	Endosfera radicular	
		Inoculado	No inoculado
<i>Agrobacterium-Rhizobium</i>	-	-	4
<i>Agromyces</i>	1	-	-
<i>Arthrobacter</i>	12	-	-
<i>Bacillus</i>	1	-	-
<i>Bradyrhizobium</i>	1	-	-
<i>Burkholderia</i>	2	-	-
<i>Cellulomonas</i>	1	-	-
<i>Curtobacterium</i>	3	-	-
<i>Flavobacterium</i>	2	-	-
<i>Janthinobacterium</i>	1	-	-
<i>Leifsonia</i>	6	-	-
<i>Luteibacter</i>	-	1	16
<i>Mesorhizobium</i>	1	1	4
<i>Methylobacterium</i>	2	-	-
<i>Microbacterium</i>	7	-	-
<i>Micrococcus</i>	2	-	-
<i>Oerskovia</i>	2	-	-
<i>Promicromonospora</i>	1	-	-
<i>Pseudomonas</i>	44	-	-
<i>Rathayibacter</i>	1	-	-
<i>Stenotrophomonas</i>	5	-	-
<i>Streptomyces</i>	2	1	3

La diversidad genotípica de las 44 cepas de la colección de *Pseudomonas* quedó reflejada en los 15 perfiles RAPD obtenidos (Figura IV.1). Aunque el perfil IX fue mostrado por hasta 12 cepas, cuatro perfiles resultaron ser únicos o específicos de una cepa concreta, como es el caso de las cepas p23, p60, p61 y p62 (Tabla IV.2).

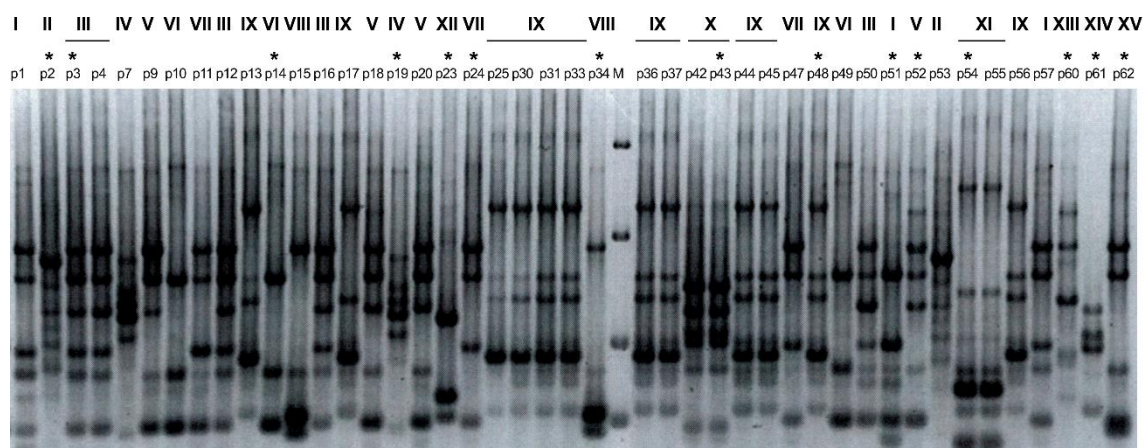


Figura IV.1. Imagen de los patrones de bandas electroforéticas relativas al genotipado RAPD, correspondientes a las 44 cepas aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. Los números romanos indican los diferentes perfiles RAPD obtenidos. Las cepas representativas de cada perfil se encuentran marcadas con un asterisco. M, marcador de peso molecular.

En el caso de las cepas aisladas del interior de la raíz de roble melojo (género *Luteibacter*) tan solo pudieron detectarse tres perfiles RAPD correlacionados en un nivel inferior al 70% en función del coeficiente de Pearson. Cabe destacar la baja diversidad genotípica de las mismas, especialmente en el caso de las 14 cepas que mostraban el perfil III de RAPD, presentando todas ellas un idéntico patrón de bandas electroforéticas (Figura IV.2). Por el contrario, el perfil II resultó específico de la cepa L13.

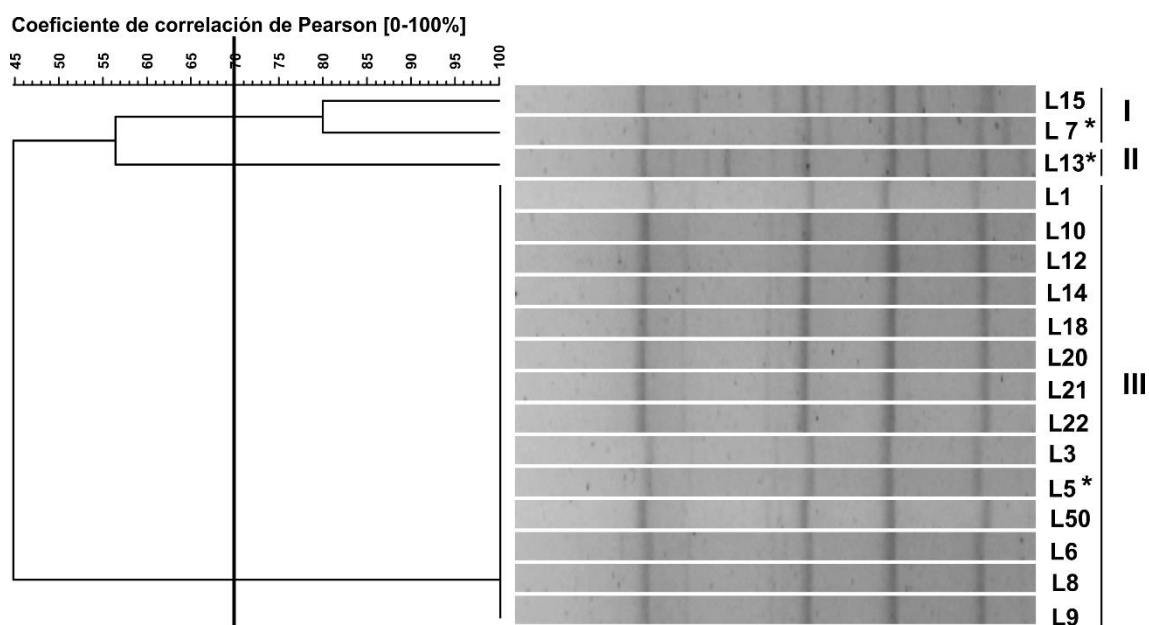


Figura IV.2. Dendrograma obtenido en base a los perfiles RAPD de las 17 cepas aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. El dendrograma fue generado en base al coeficiente de correlación de Pearson y mediante el algoritmo UPGMA. La línea vertical representa el punto de corte establecido para la delimitación de los grupos RAPD (70%). Los números romanos indican los diferentes perfiles RAPD obtenidos. Las cepas representativas de cada perfil se encuentran marcadas con un asterisco.

IV.3.2. Análisis de los genes *rrs* y *rpoD*

De las 44 cepas del género *Pseudomonas*, el gen *rrs* de la cepa p23 tuvo que ser descartado de los análisis ya que este no pudo ser secuenciado de forma completa. El porcentaje de identidad de la secuencia del gen ribosomal del resto de cepas se encontró comprendido en el rango 98.8-99.9%, con respecto a la correspondiente de las cepas tipo de las especies más próximas (*P. koreensis*, *P. silesiensis*, *P. granadensis*, *P. gessardii*, *P. helmanticensis* y *P. migulae*). No pudo observarse una absoluta correspondencia entre los perfiles RAPD de cada cepa y la especie más próxima de las mismas según la secuencia del gen *rrs* ya que ciertas cepas que mostraban diferentes patrones de bandas electroforéticas resultaron próximas a la misma especie. Tan solo las cepas que exhibían los perfiles RAPD II, IX, X y XIII resultaron la excepción de dicha observación (Tabla IV.2). Debe remarcarse que pese a que en numerosos casos se obtuvieron valores de identidad próximos al 100%, el gen ribosomal tan solo es válido para la determinación del posible linaje de adscripción de las cepas del género *Pseudomonas*. En este caso, los porcentajes de identidad obtenidos apuntaron a que podría tratarse de cepas pertenecientes al linaje de *P. fluorescens* definido por Mulet y colaboradores (2010), por su moderada-elevada proximidad a especies incluidas en el mismo.

Capítulo IV

Tabla IV.2. Características moleculares de las 44 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. Nd, No determinado. Con un asterisco se indican las cepas representativas de cada perfil RAPD.

Cepa	Perfil RAPD	Cepa tipo más próxima (<i>rrs</i>)	Identidad (%)	Cepa tipo más próxima (<i>rpoD</i>)	Identidad (%)
p1	I	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.2
p2*	II	<i>P. silesiensis</i> A3 ^T	99.6	<i>P. prosekii</i> AN/28/1 ^T	95.8
p3*	III	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p4	III	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p7	IV	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. lactis</i> DSM 29167 ^T	97.5
p9	V	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p10	VI	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p11	VII	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.2
p12	III	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p13	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p14*	VI	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p15	VIII	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.0
p16	III	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	Nd	Nd
p17	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p18	V	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.8
p19*	IV	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. lactis</i> DSM 29167 ^T	97.5
p20	V	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.0
p23*	XII	Nd	Nd	Nd	Nd
p24*	VII	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.2
p25	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p30	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p31	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p33	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p34*	VIII	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.0
p36	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p37	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3

Resultados

Cepa	Perfil RAPD	Cepa tipo más próxima (<i>rrs</i>)	Identidad (%)	Cepa tipo más próxima (<i>rpoD</i>)	Identidad (%)
p42	X	<i>P. gessardii</i> CIP 105469 ^T	99.6	<i>P. lactis</i> DSM 29167 ^T	98.5
p43*	X	<i>P. gessardii</i> CIP 105469 ^T	99.6	<i>P. lactis</i> DSM 29167 ^T	98.5
p44	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p45	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p47	VII	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.2
p48*	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p49	VI	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p50	III	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7
p51*	I	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.3
p52*	V	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.8
p53	II	<i>P. silesiensis</i> A3 ^T	99.6	<i>P. prosekii</i> AN/28/1 ^T	95.8
p54*	XI	<i>P. helmanticensis</i> OHA11 ^T	99.6	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	91.7
p55	XI	<i>P. helmanticensis</i> OHA11 ^T	99.6	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	91.7
p56	IX	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.3
p57	I	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.8	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	93.2
p60*	XIII	<i>P. migulae</i> NBRC 103157 ^T	99.7	<i>P. migulae</i> NBRC 103157 ^T	96.1
p61*	XIV	<i>P. helmanticensis</i> OHA11 ^T	99.9	<i>P. granadensis</i> F-2787700 ^T	94.0
p62*	XV	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	98.9	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	92.7

Dado que en el caso del género *Pseudomonas* la resolución interespecífica que es posible alcanzar mediante el análisis del gen *housekeeping rpoD* es elevada, este fue secuenciado al objeto de identificar y conocer las relaciones evolutivas de las cepas en estudio. Debe remarcarse que no fue posible amplificar mediante PCR dicho gen en el caso de las cepas p16 y p23. En tanto, las 42 cepas restantes se encontraban relacionadas con cinco especies distintas del género según la secuencia de dicho gen, mostrando porcentajes de identidad de secuencia variables. A su vez, cabe destacar que la secuencia del gen *housekeeping* de todas las cepas incluidas en el mismo perfil RAPD resultó idéntica para todas ellas. Por ello, se seleccionó una cepa representativa de cada perfil para el estudio de las relaciones filogenéticas entre las mismas.

Aquellas cepas incluidas en los perfiles RAPD I, III, V, VI, VII, VIII y XV mostraron valores de identidad superiores a 98.6% entre sí en cuanto a la secuencia del gen *rpoD*. A su vez, estas resultaron similares en un 92.7-93.2% a la cepa *P. abietaniphila* ATCC 700689^T en cuanto a la secuencia de dicho gen. En el árbol filogenético basado en los genes *rrs* y *rpoD* concatenados, las cepas representativas de dichos perfiles quedaron agrupadas en un mismo clado con la cepa tipo mencionada, con un soporte de 100% de *bootstrap*. Por lo tanto, tal y como se aprecia en la Figura IV.3, estas pertenecen al grupo filogenético '*P. lutea*' descrito por Mulet y colaboradores (2010), García-Valdés y Lalucat (2016) y Peix y colaboradores (2018).

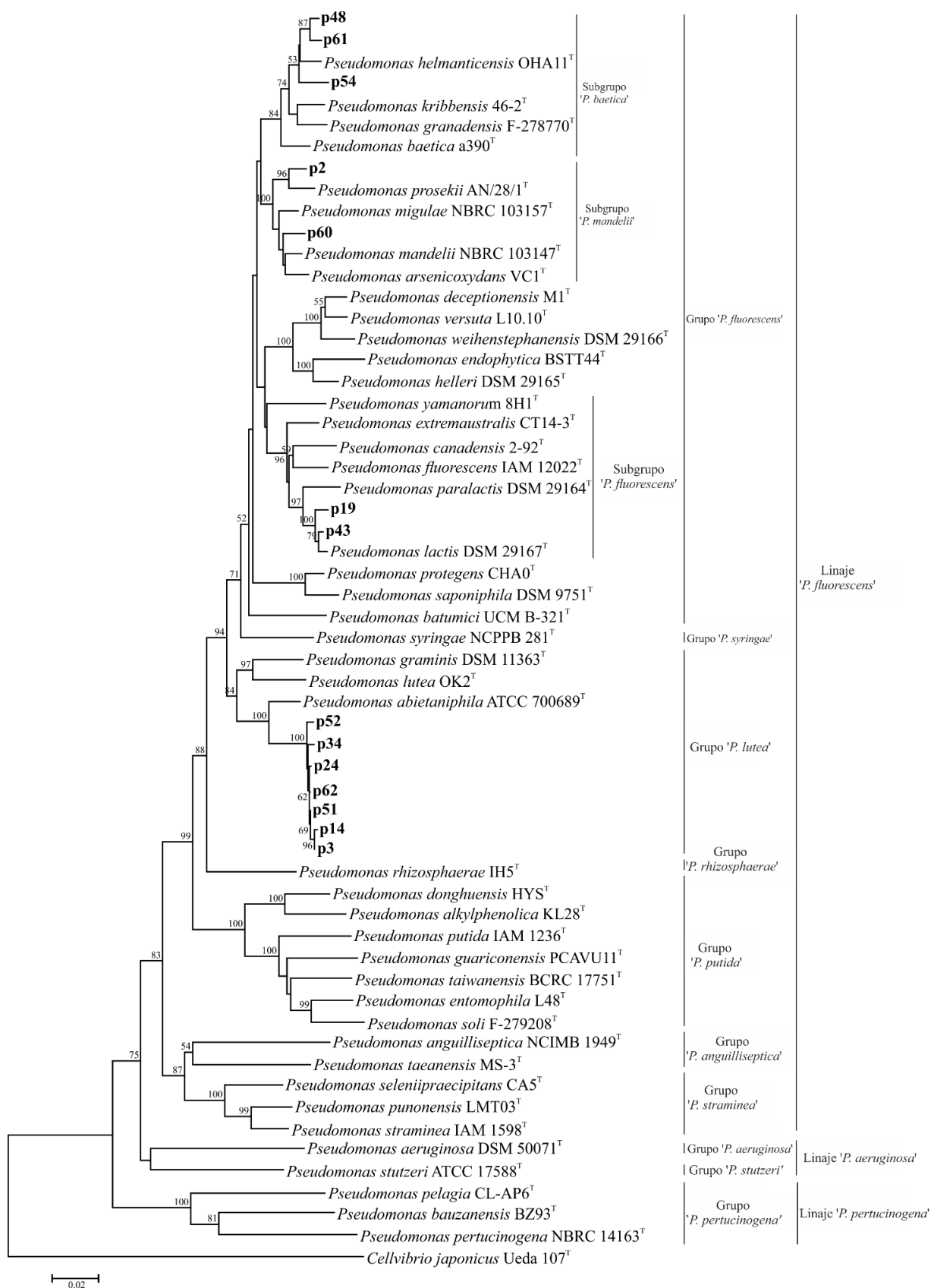


Figura IV.3. Árbol filogenético enraizado basado en la secuencia de los genes *rrs* y *rpoD* concatenados. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas representativas de cada perfil RAPD y las cepas tipo de las especies más próximas válidamente descritas para el género *Pseudomonas*. Se incluyen además varias cepas tipo de especies del mismo género pertenecientes a diferentes grupos y subgrupos de los tres linajes descritos para el género

Pseudomonas. Por reducir la complejidad del árbol filogenético, cuanto mayor fue la distancia filogenética entre las cepas en estudio y las cepas tipo de otros grupos filogenéticos, menor número de cepas tipo fueron incluidas en los mismos. Los valores de *bootstrap* fueron calculados para 1000 réplicas, indicándose en los correspondientes nodos tan solo aquellos valores ≥ 50 . La barra representa sustituciones de 2 nucleótidos por cada 100. El perfil RAPD al que representa cada cepa se indica en la Tabla IV.2. Los números de acceso de las cepas tipo en las bases de datos correspondientes se recogen en la Tabla A.2 (Anexos).

Por otro lado, el resto de cepas analizadas perteneció al grupo filogenético '*P. fluorescens*', encontrándose distribuidas en diferentes subgrupos. Concretamente, las cepas p2 y p53 (perfil RAPD II) mostraron una identidad de secuencia del gen *rpoD* de tan solo 95.8% con respecto a la cepa tipo de la especie más próxima, esto es, *P. prosekii*. A su vez, la cepa representativa p2 quedó agrupada en el mismo clado del árbol filogenético basado en los dos genes en estudio con la cepa p60 (perfil RAPD XIII) y la cepa tipo más próxima a esta, *P. migulae* NBRC 1013157^T, aunque en diferentes ramas del mismo (Figura IV.3). El porcentaje de identidad de la secuencia del gen *rpoD* entre p2 y p60 fue de 93.3%. Debe destacarse que aunque ambas cepas aisladas de la rizosfera de roble melojo mostraron porcentajes considerablemente bajos de identidad de la secuencia del gen *rpoD* con respecto al correspondiente de las cepas tipo mencionadas (Tabla IV.2), estas pertenecen al subgrupo '*P. mandelii*' del grupo filogenético '*P. fluorescens*'.

Las cepas cuyo patrón de bandas electroforéticas se correspondió con los perfiles RAPD IV y X se encontraron relacionadas con la especie *P. lactis* según la secuencia del gen *rpoD* (97.5-98.5% de identidad nucleotídica). En el árbol filogenético basado en este gen y el gen *rrs*, las cepas representativas de estos perfiles RAPD quedaron agrupadas con un alto valor de *bootstrap* con las cepas tipo de las especies *P. lactis* y *P. paralactis* (Figura IV.3), perteneciendo por tanto al subgrupo '*P. fluorescens*' del grupo filogenético que recibe el mismo nombre. Cabe destacar que el porcentaje de identidad de la secuencia del gen *rpoD* entre las cepas representativas de ambos perfiles RAPD (p19 y p43) fue de 97.3%.

Finalmente, las cepas que exhibieron los perfiles RAPD IX, XI y el perfil XIV único, mostraron un porcentaje considerablemente bajo de identidad de la secuencia del gen *rpoD* con respecto al correspondiente de la cepa *P. granadensis* F-2787700^T; concretamente los valores registrados se encontraban comprendidos entre 91.7 y 94.3% de identidad nucleotídica (Tabla IV.2). En el árbol filogenético basado en los genes *rrs* y *rpoD* concatenados, las cepas representativas de los mencionados perfiles se agruparon en el mismo clado conjuntamente con la cepa tipo de la especie *P. helmaticensis* aunque con un soporte de *bootstrap* no demasiado alto. No obstante, todas ellas resultaron ser miembros del subgrupo '*P. baetica*' del grupo filogenético '*P. fluorescens*'. Cabe mencionar que las tres cepas representativas se encontraban localizadas en el mismo clado, pero en dos ramas diferentes del mismo (Figura IV.3), siendo el porcentaje de identidad de secuencia del gen *rpoD* entre p61 y p48 de 98.8%, e inferior a 94.5% entre estas y p54.

En definitiva, las 42 cepas cuyas relaciones filogenéticas pudieron ser estudiadas, pertenecieron al linaje de *P. fluorescens*.

Resultados

En el caso de las 17 cepas aisladas del interior de la raíz de roble melojo, se obtuvieron secuencias del gen *rrs* de 1415 pb que resultaron idénticas entre sí, no detectándose por lo tanto polimorfismo alguno en este gen. Cuando estas fueron comparadas con aquellas correspondientes a las de las cepas tipo descritas para este género, y a la cepa *L. jiangsuensis* JW-64-1 (nombre de especie sin validez taxonómica), se obtuvo un 100% de identidad con respecto a la secuencia de la cepa *Luteibacter rhizovicinus* LJ96^T, quedando agrupadas en el correspondiente árbol filogenético con un 100% de valor de *bootstrap* (Figura IV.4).

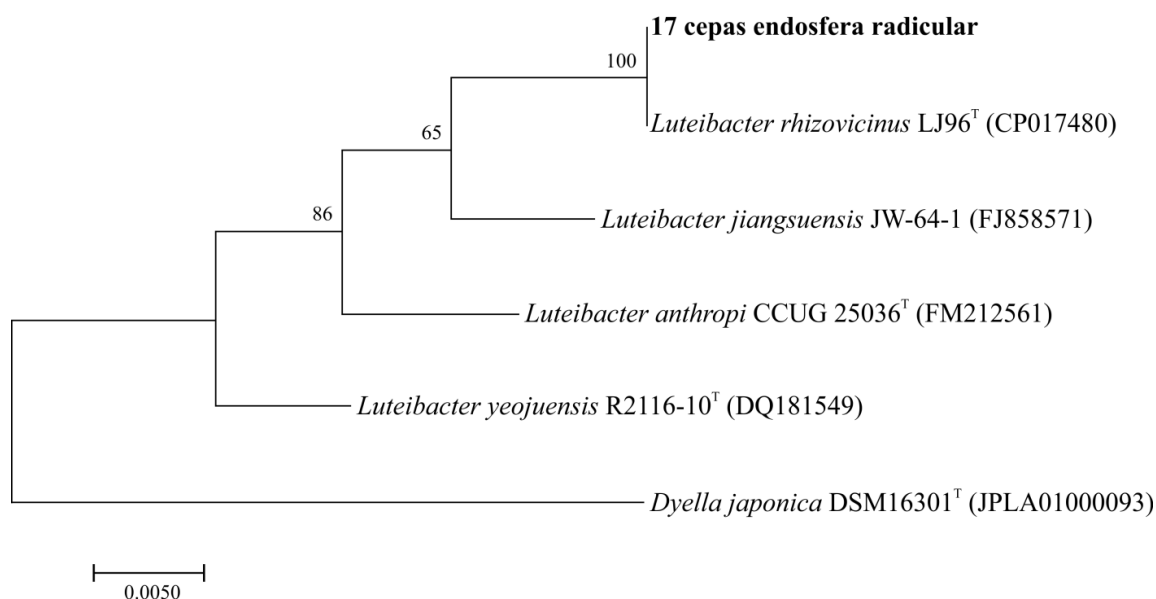


Figura IV.4. Árbol filogenético enraizado basado en las secuencias del gen *rrs*. El árbol fue obtenido mediante el algoritmo Neighbour-joining incluyendo las cepas en estudio y las cepas tipo de las especies válidamente descritas para el género *Luteibacter*, y la cepa *L. jiangsuensis* JW-64-1. Los valores de *bootstrap* fueron calculados para 1000 réplicas, indicándose en los correspondientes nodos tan solo aquellos valores ≥ 50 . La barra representa sustituciones de 5 por cada 1000 nucleótidos. Entre paréntesis se muestra el número de acceso de las cepas tipo en la base de datos GenBank®.

IV.4. Discusión

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el componente microbiano del holobionte vegetal – y en concreto las bacterias asociadas a las raíces – se considera muy influyente en el *fitness* del hospedador vegetal (Apartado 2.2.2.2.). Así, los bioinoculantes para ser aplicados en plantas tienden a ser formulados a base de microorganismos que forman parte de la microbiota autóctona del propio hospedador, tratando de evitarse problemas asociados a las invasiones por microorganismos exógenos, y buscando la adaptación al nicho ecológico donde van a ser aplicados o a ejercer su función. De forma preliminar al posible desarrollo de futuros bioinoculantes para plantas de quercíneas, se pretendió caracterizar genotípicamente e identificar bacterias que de forma natural habitan la rizosfera y endosfera radicular de *Q. pyrenaica*.

Pese al empleo de medios de cultivo selectivos, el número de aislados obtenidos de la rizosfera de roble melojo fue considerablemente superior al correspondiente a la endosfera radicular, documentándose a su vez un mayor número de géneros diferentes

identificados. Aunque dicho resultado se encuentra en consonancia con la mayor riqueza típicamente observada en la rizosfera respecto al interior de la raíz de diversas especies vegetales, incluidas leñosas (Coleman-Derr *et al.*, 2016; Beckers *et al.*, 2017), debe tenerse en cuenta que en este Capítulo únicamente fue analizada la fracción cultivable del procarioma total, la cual representa tan solo una pequeña proporción de la diversidad total existente en la naturaleza (Stewart, 2012). Asimismo, la diversidad genotípica (determinada en base a los perfiles RAPD) de las cepas aisladas de la rizosfera fue considerablemente superior a la registrada en el caso de aquellas aisladas del interior de la raíz. En este sentido, destacó la detección de tan solo tres perfiles RAPD diferentes en el caso de los aislados endofíticos, y especialmente la identidad absoluta del perfil de bandas electroforéticas registrado para 14 de las 17 cepas en estudio. La idéntica distribución de la secuencia de 15 pb del gen III del bacteriófago M13 a lo largo del genoma de las 14 cepas sugiere una gran homogeneidad en las secuencias genómicas de las mismas, siendo probable el origen clonal de las 14 cepas. En tal caso, la mayor diversidad genotípica de las cepas rizosféricas con respecto a las endosféricas podría ser fruto del mencionado origen clonal de estas últimas.

Tal y como se ha mencionado, las bacterias aisladas de la rizosfera de roble melojo resultaron genotípicamente diversas, lo cual quedó reflejado en la obtención de hasta 15 perfiles RAPD diferentes. Dicha herramienta de genotipado resultó de gran utilidad para revelar la diversidad infraespecífica de la colección de bacterias del género *Pseudomonas*. Especialmente en el caso de aquellas que mostraron diferentes perfiles RAPD pero que agruparon juntas en el árbol filogenético de genes concatenados, esto es, las representantes de los perfiles I, III, V, VI, VII, VIII y XV pertenecientes a la misma especie y relacionadas filogenéticamente todas ellas con *P. abietaniphila*. Así pues, en casos como el mencionado, el genotipado mediante RAPD se presenta como un método de especial utilidad para discriminar entre cepas próximamente relacionadas.

En los medios de cultivo selectivos empleados, el género del que mayor representación se obtuvo en las muestras rizosféricas fue *Pseudomonas*, lográndose aislar 44 cepas pertenecientes al mismo. Se trata de un género muy ubicuo capaz de habitar nichos ecológicos muy diversos, frecuentemente hallado en suelos y muestras obtenidas de tejidos vegetales de diversa índole. Tal es así, que de las 70 nuevas especies descritas en el periodo 2009-2017, 30 fueron aisladas de muestras de suelo (Peix *et al.*, 2018). La diversidad taxonómica de bacterias de este género asociadas a plantas se encuentra evidenciada por la gran cantidad de especies distintas descritas que habitan nichos de origen vegetal. Así, durante el periodo señalado se han aislado nuevas especies a partir de diversos hospedadores, incluidas plantas leñosas, véase el caso de *P. populi* y *P. tarimensis* aisladas ambas de *Populus euphratica* (Anwar *et al.*, 2016; 2017) o *P. caspiana* aislada de cítricos (Busquets *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, es la primera vez que se documenta el aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* de la rizosfera de la leñosa *Q. pyrenaica*.

Teniendo en consideración las comparaciones de las secuencias génicas y el análisis filogenético realizado, las cepas seleccionadas podrían representar hasta cinco especies nuevas del género *Pseudomonas*. Por un lado, las cepas p2 y p60 mostraron porcentajes de identidad de la secuencia del gen *housekeeping* de 95.8 y 96.1% con

Resultados

respecto a las especies más próximas, respectivamente (Tabla IV.2). Dichos niveles son inferiores al existente entre dos especies diferentes del género *Pseudomonas*, esto es, inferiores al 97% (Mulet *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta la topología del árbol filogenético, estas formaron dos linajes independientes quedando agrupadas en el clado en el que se halla *P. mandelii*, por lo que todo ello revela que podría tratarse de dos nuevas especies pertenecientes al subgrupo '*P. mandelii*'.

Las cepas p3, p14, p24, p34, p51, p52 y p62 mostraron valores de identidad del gen *rpoD* muy inferiores a los límites actuales para la delineación de especies con respecto a la especie filogenéticamente más próxima, esto es, *P. abietaniphila* (ver Tabla IV.2). Además, todas ellas quedaron agrupadas en la misma rama del árbol filogenético y separadamente de dicha especie y de las restantes pertenecientes al grupo filogenético '*P. lutea*'. Por ello, las mencionadas cepas aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica* podrían pertenecer a una nueva especie de dicho grupo filogenético.

Por otro lado, la especie *P. helmanticensis* aislada también de un suelo forestal (Ramírez-Bahena *et al.*, 2014) resultó la especie filogenéticamente más próxima a las cepas p48, p61 y p54. Si bien las tres mostraron valores de identidad del gen *rpoD* considerablemente bajos con respecto al correspondiente de la mencionada especie, las cepas p48 y p61 formaron un linaje independiente (al igual que lo hizo p54) en el clado en el que se agrupan las especies del subgrupo '*P. baetica*'. Por lo tanto, atendiendo a la divergencia génica y la posición filogenética de las tres cepas podría concluirse que p54, y p48 y p51 podrían representar una y dos cepas, respectivamente, de dos nuevas especies del mencionado subgrupo.

Destaca el caso de las cepas representativas de los perfiles RAPD IV (p19) y X (p43). La primera de ellas mostró un porcentaje de identidad de secuencia del gen *rpoD* de 97.5% respecto a la especie *P. lactis*, encontrándose dicho valor próximo al límite actual para la delimitación de especies de este género (97%). Sin embargo, la topología del árbol filogenético basado en los dos genes concatenados reveló que p19 podría representar una nueva especie del género *Pseudomonas* dada su localización en una rama independiente a aquella en las que se hallaban p43 y *P. lactis* DMS 29167^T, siendo del 100% el soporte de *bootstrap* del correspondiente clado. Sin embargo, se deberían realizar más estudios para esclarecer la situación taxonómica de dicha cepa y esclarecer si se trata de una nueva especie, dado que la identidad de secuencia del gen *rpoD* con respecto a la especie conocida más próxima se encuentra en el límite de los estándares taxonómicos vigentes. Por el contrario, teniendo en cuenta la similitud de la cepa p43 con *P. lactis* en cuanto a la secuencia del gen *rpoD* y la relación filogenética entre estas, podría considerarse que la cepa representativa del perfil RAPD X (p43) podría pertenecer a la especie *P. lactis* del subgrupo '*P. fluorescens*'. Dicha especie fue obtenida a partir de leche cruda bovina y descrita por von Neubeck y colaboradores (2017), y hasta donde alcanza nuestro conocimiento, se trata de la primera vez que una cepa de dicha especie es aislada de un ecosistema forestal.

Por otro lado, debe remarcarse que cepas que mostraron diferente secuencia del gen *rpoD* (y por ende, cuya especie más próximamente relacionada en base a dicho gen era distinta), resultaron similares a la misma especie según el gen *rrs*. Este hecho podría verse explicado por la baja capacidad de los análisis basados en el gen ribosomal para discriminar entre especies que han divergido recientemente. Tal es así que en otros

trabajos se ha demostrado que para el género *Pseudomonas*, los resultados de los análisis de tipo MLSA basados en varios genes *housekeeping* y en el gen *rrs* concatenados no difieren respecto a aquellos obtenidos cuando no se incluye el gen ribosomal (Pascual *et al.*, 2010). Dichos autores mencionan que la baja capacidad resolutoria del gen *rrs* se ve neutralizada o contrarrestada por la mayor tasa evolutiva de los genes *housekeeping*.

En otro orden de cosas, debe puntualizarse que no se trata de la primera vez que se logran aislar nuevas especies de un Espacio Protegido. Así, otros autores han aislado y descrito previamente otras especies procedentes de muestras de suelo de varios Parques Naturales en España, como los Parques de Almijara, Alhama e incluso Sierra Nevada (Pascual *et al.*, 2014; 2015). Por otro lado, el aislamiento de hasta cinco posibles nuevas especies del género *Pseudomonas* a partir de la rizosfera de *Q. pyrenaica* se encuentra en línea con otros trabajos en los que se han descrito diferentes nuevas especies aisladas de varios ecosistemas forestales (Wu *et al.*, 2014; Ramírez-Bahena *et al.*, 2014; Frasson *et al.*, 2017). De esta manera queda patente que este tipo de entornos constituye un interesante reservorio de especies desconocidas de este género. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que no es de extrañar la considerable cantidad de posibles nuevas especies aquí registrada, ya que al tratarse un género notablemente ubicuo, es esperable que el número de especies adscritas al mismo crezca conforme se vayan estudiando nuevos nichos ecológicos, tal y como sucede con la rizosfera de *Q. pyrenaica*.

Por otro lado, *Luteibacter* es otro género perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria* que se encuentra frecuentemente asociado a diferentes hospedadores vegetales. Así, ha sido aislado del suelo suelto próximo a algunas especies leñosas como sauce (*Salix caprea*) (Leigh *et al.*, 2006), tejo (*Taxus cuspidata*) (Li *et al.*, 2007), y de la rizosfera de otras plantas como cebada (*Hordeum vulgare*) (Johansen *et al.*, 2005) e incluso de pino de Corea (*Pinus koraiensis*) (Akter y Huq, 2018). Además, este género ha sido detectado mediante técnicas de secuenciación masiva también en la hojarasca en bosques dominados por diferentes especies arbóreas como *Quercus mongolica*, *Larix gmelinii* (Alerce de Gmelin), *Juglans mandshurica* (Zhang *et al.*, 2019), y *Q. petraea* o roble albar, llegando incluso a ser aislado en este último caso (López-Mondéjar *et al.*, 2016a). En el presente trabajo se registró una proporción promedio de secuencias correspondientes a este género inferior a 0.017% en las muestras rizosféricas analizadas mediante tecnología Illumina (HAF, BRF, XZF, NPF, AZC, AZL; Capítulo III), sin embargo no pudo detectarse en los sitios HAF, BRF ni XZF mediante pirosecuenciación (Capítulo II), probablemente debido a la menor profundidad de muestreo y cobertura en este último caso.

Cabe destacar que la naturaleza endofítica del género *Luteibacter* ha sido raramente descrita. Por un lado, Hoffman y colaboradores (2013) aislaron una cepa perteneciente a este género del interior de las hifas de un hongo endófito foliar de *Platycadus orientalis*, especie de la familia de las cupresáceas. Otros autores lograron aislar una cepa de este género de la endosfera de la raíz de una planta ornamental, *Platycodon grandiflorum* (Cui *et al.*, 2016). Cabe mencionar que, si bien las 17 cepas pertenecientes a este género fueron aisladas del interior de la raíz de robles localizados en NPF, también pudieron detectarse secuencias correspondientes a *Luteibacter* en las


muestras rizosféricas tanto de plantones inoculados como no inoculados ubicados en la misma área, aunque su abundancia relativa promedio fue inferior a 0.008% (Capítulo III). Así pues, teniendo en cuenta los resultados de esta Tesis Doctoral y la literatura mencionada, podría considerarse que este género forma parte de la microbiota de ciertos holobiontes vegetales, encontrándose asociado tanto al exterior como al interior de la raíz de *Q. pyrenaica*. En el caso concreto de la endosfera radicular de dicha especie leñosa, el análisis de la secuencia del gen *rrs* y la topología del árbol filogenético correspondiente demostraron que las 17 cepas en estudio probablemente pertenezcan a la especie *L. rhizovicius*.

IV.5. Perspectivas futuras

Tal y como revelaron los resultados del Capítulo II, el género *Phenylobacterium* es uno de los que podría considerarse de mayor interés en la rizosfera de *Q. pyrenaica*, sin embargo ninguna cepa correspondiente a dicho género pudo ser aislada en este trabajo. Por lo tanto, para obtener aislados de dicho género a partir del suelo rizosférico correspondiente a roble melojo, otros medios de cultivo deberían ser empleados. Debe puntualizarse que varios autores han logrado aislar miembros de dicho género de la rizosfera de ginseng (*Panax ginseng*) empleando el medio de cultivo R2A (Farh *et al.*, 2016) y de la hojarasca de un bosque dominado por *Picea abies*, en el medio VL55 (Lladó *et al.*, 2016). Así pues, podrían emplearse dichos medios y las condiciones de cultivo empleadas por los mencionados autores para tratar de aislar bacterias pertenecientes al género *Phenylobacterium*.

Por otro lado, debe destacarse que pese a que el análisis de la secuencia del gen *rpoD* y el análisis filogenético basado en el mismo y en el gen *rrs* no mostraron discordancias y proporcionaron resultados robustos en el caso de la mayoría de las cepas estudiadas del género *Pseudomonas*, deberían analizarse además otros genes *housekeeping* como *gyrB* y *rpoB* en aras de definir las posibles nuevas especies aquí aisladas. El análisis de dichos genes sería especialmente recomendable en el caso concreto de la cepa p19, cuya afiliación taxonómica no pudo determinarse con precisión.

Debe mencionarse que las herramientas actuales empleadas en el ámbito de la taxonomía del género *Pseudomonas* se basan también en el análisis de la secuencia de los genomas completos de las cepas en estudio. La comparación de dicha secuencia con la correspondiente de cepas tipo de especies conocidas proporciona una imagen más precisa de las relaciones filogenéticas entre bacterias, permitiendo la diferenciación de las mismas. A su vez, el número de genomas secuenciados y disponibles en bases de datos de acceso público es considerable, lo cual contribuye a alcanzar una buena resolución mediante el empleo de dichas herramientas (Peix *et al.*, 2018). Por lo tanto, sería recomendable secuenciar el genoma de las cepas representativas de los grupos RAPD para determinar con absoluta fiabilidad la especie de adscripción de las mismas, y dilucidar si efectivamente se trata de nuevas especies.

A photograph of a forest floor covered with dry, brown oak leaves and some green leaves. Two large, light-colored mushrooms are visible, one in the upper right and one in the lower left. The text is overlaid on the right side of the image.

CAPÍTULO V

Caracterización enzimática de las cepas asociadas a la raíz de *Quercus pyrenaica*. Determinación de la localización de los enzimas extracelulares producidos implicados en la descomposición de la materia orgánica

.....

La imagen muestra la hojarasca y setas desarrolladas bajo individuos de *Quercus pyrenaica*.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

V.1. Introducción

V.1.1. El papel de las bacterias en la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas forestales

La microbiota que caracteriza los bosques – especialmente las comunidades fúngicas y bacterianas que habitan la hojarasca depositada, las maderas muertas, el suelo y la rizosfera – contribuye a la homeóstasis del ecosistema forestal mediante diversos mecanismos. La interacción con sus correspondientes hospedadores vegetales y la intervención en los ciclos biogeoquímicos y en el reciclado o recambio de los nutrientes son ejemplos de sus actuaciones, siendo la descomposición de la materia orgánica un proceso esencial en el que los microorganismos participan. En lo que respecta a los procesos ecosistémicos relativos a los bosques y más concretamente en cuanto a la descomposición de la biomasa muerta se refiere, los hongos saprotróficos y los micorrícicos que habitan los suelos forestales han sido estudiados intensamente (Voříšková *et al.*, 2014; Sterkenburg *et al.*, 2015). Sin embargo, el papel de las bacterias permanece aún poco estudiado (Lladó *et al.*, 2017).

La biomasa vegetal se encuentra fundamentalmente compuesta por celulosa y diferentes tipos de hemicelulosas así como por otros polímeros como lignina y pectina, suponiendo su degradación un paso clave del ciclo del C en los ecosistemas terrestres. Tradicionalmente los hongos han sido considerados los principales protagonistas de la descomposición de la biomasa vegetal (de Boer *et al.*, 2005), siendo el papel de las bacterias en este proceso relativamente poco estudiado. Sin embargo, cada vez más trabajos describen la potencial contribución de las mismas en los procesos degradativos que tienen lugar en la hojarasca y en los suelos forestales (Eichorst y Kuske, 2012; Štursová *et al.*, 2012). Lladó y colaboradores (2016) remarcaron el gran potencial de ciertas bacterias aisladas de un bosque de *Picea abies* para degradar polisacáridos vegetales como celulosa y hemicelulosas de diferentes tipos. Mediante ensayos enzimáticos estos autores demostraron el potencial degradador de cepas filogenéticamente divergentes, concretamente pertenecientes a los géneros *Granulicella*, *Edaphobacter*, *Terriglobus*, *Bryocella*, *Acidobacterium* (phylum *Acidobacteria*), *Frigobacterium* (phylum *Actinobacteria*), *Dyella* (phylum *Gammaproteobacteria*), *Burkholderia* (phylum *Betaproteobacteria*), *Caulobacter*, *Phenylobacterium* (phylum *Alphaproteobacteria*), entre otros. A su vez, la capacidad celulolítica de cepas adscritas a los géneros *Mucilaginibacter*, *Pedobacter* y *Luteibacter* procedentes de un bosque de *Quercus petraea* ha sido demostrada a través de análisis genómicos, proteómicos y enzimáticos (López-Mondéjar *et al.*, 2016a). De forma similar, diferentes especies del género *Streptomyces* aisladas también de un suelo forestal han mostrado la habilidad de crecer en presencia de lignocelulosa como única fuente de C, así como de producir enzimas implicados en la degradación de celulosa y de diferentes tipos de hemicelulosas (Větrovský *et al.*, 2014). La riqueza de bacterias de origen filogenético diverso con potencial para degradar polímeros vegetales refleja que dicha propiedad no es atribuible exclusivamente a las comunidades fúngicas, ni a un taxón bacteriano especializado.

Tras la celulosa, la quitina es el biopolímero más abundante de la Tierra (Jolles y Muzzarelli, 1999), siendo uno de los principales constituyentes de la pared celular fúngica así como del exoesqueleto de artrópodos (Bartnicki-Garcia, 1968). Numerosos

Resultados

géneros bacterianos adscritos a diferentes *phyla* son capaces de producir quitinasas para poder acceder al C y N contenidos en este polímero compuesto por unidades de N-acetilglucosamina. Entre dichos géneros se incluyen *Streptomyces* (Jha *et al.*, 2016), *Glycomyces*, *Cellulomonas*, *Actinoplanes*, *Actinokineospora*, *Kitasatospora*, *Nonomurea* (Kawase *et al.*, 2004), *Pseudomonas*, *Ewingella*, *Pedobacter*, *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Chitinophaga* (Brabcová *et al.*, 2016), entre otros. Es de remarcar que la degradación bacteriana de la quitina puede tener una implicación dual, pudiendo suponer por un lado un mecanismo antagónico frente a hongos del suelo, y una adaptación nutricional por otro. Mediante la actividad de los enzimas quitinolíticos, las bacterias pueden degradar uno de los componentes principales de la pared celular de los hongos, teniendo por tanto un efecto antagónico sobre los mismos. En tanto, el hecho de que las bacterias sean los principales descomponedores del micelio fúngico muerto (López-Mondéjar *et al.*, 2018), que la actividad N-acetilglucosaminidasa se vea incrementada durante el crecimiento bacteriano sobre el micelio (Brabcová *et al.*, 2018), junto con el hecho de que muchas bacterias son capaces de desarrollarse a partir de los productos finales de la degradación de la quitina (por ejemplo, a partir de N-acetilglucosamina) (Lladó *et al.*, 2016) ponen de manifiesto la implicación nutricional de la descomposición de la quitina así como la relevancia de las bacterias quitinolíticas en los ciclos del C y N.

Las bacterias son conocidas por su habilidad para acceder a uno de los nutrientes limitantes en muchos suelos, el P. El fósforo orgánico puede suponer el 4-90% del P total en el suelo, siendo por tanto su transformación un proceso fundamental en algunos casos (Sharma *et al.*, 2013). Durante la descomposición de la materia orgánica, el fósforo orgánico (por ejemplo, en forma de ésteres de fosfato) es transformado gracias a la actividad de enzimas como fosfatasas (fosfomonoesterasas) alcalinas o ácidas, siendo estas últimas las más habituales en suelos ácidos. Cabe destacar que aunque este tipo de procesos y enzimas no han sido tan ampliamente estudiados como aquellos concernientes al ciclo del C y del N, es conocido el papel de bacterias pertenecientes a los *phyla* *Actinobacteria*, *Acidobacteria* así como a las clases *Alpha*- y *Betaproteobacteria* en el recambio del P en bosques templados (Lladó *et al.*, 2017).

Los lípidos son otro importante componente de la materia orgánica vegetal, animal y microbiana, y por tanto su transformación suscita gran interés. En comparación con otras biomoléculas como carbohidratos y proteínas, el tiempo de residencia de los lípidos en el suelo es mucho mayor, considerándose de forma general que este tipo de compuestos muestra una resistencia selectiva a la degradación microbiana (Dinel *et al.*, 1990). La descomposición y estabilidad de los lípidos es dependiente de la actividad de los microorganismos así como de las características fisicoquímicas de los suelos (Jambu *et al.*, 1985). Sin embargo, poco se conoce sobre el proceso de descomposición de los lípidos llevado a cabo por las bacterias que habitan los ecosistemas forestales. Algunos componentes lipídicos ejercen un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, fenómeno que puede verse acentuado en suelos de pH ácido (Dinel *et al.*, 1990). Por el contrario, es sabido que en suelos alcalinos y neutros la descomposición de los lípidos es debida fundamentalmente a la actividad de lipasas de origen microbiano. A pesar de que algunos autores han comprobado la importante contribución de las lipasas microbianas a los procesos lipolíticos en un bosque de *Q. petraea* (Brabcová *et al.*,

2018), la identidad de los principales taxones bacterianos productores de dichas enzimas en los ecosistemas forestales permanece todavía prácticamente desconocida.

Aunque la literatura mencionada arroja algo de luz sobre los procesos degradativos llevados a cabo por las bacterias que habitan principalmente la hojarasca y el suelo suelto, el conocimiento sobre el papel de las bacterias que habitan en la endosfera radicular y la rizosfera de las especies forestales es escaso.

V.1.2. Principales protagonistas de la degradación de la materia orgánica: los enzimas extracelulares

La transformación de la materia orgánica llevada a cabo por bacterias del suelo es mediada gracias a enzimas extracelulares que son liberados al medio externo o que por el contrario se encuentran asociados a la pared celular de la bacteria productora, bien adheridos o bien integrados en la misma (Traving *et al.*, 2015). Una vez que los enzimas han sido excretados libremente al medio circundante, estos generalmente se enfrentan a condiciones ambientales hostiles (Burns, 2010). En el medio extracelular los enzimas libres pueden ser adsorbidos, inactivados o degradados por proteasas (Burns, 1982), si bien una vez han difundido, la actividad de este tipo de enzimas puede suponer la formación de una gran nube de nutrientes (Traving *et al.*, 2015). Pese a que tanto los enzimas asociados a las células como los libremente excretados son capaces de generar en última instancia productos que estarían disponibles para todos los microorganismos del suelo, las células productoras tienen más oportunidades de acceder a aquellos productos que se encuentran en sus proximidades, por ejemplo, cerca de la superficie celular (Burns *et al.*, 2013). A su vez, el hecho de que algunos enzimas posean dominios de unión al sustrato les confiere a las bacterias que los sintetizan la habilidad de interactuar con el sustrato específico, como es el caso de la celulosa y otros polisacáridos (López-Mondéjar *et al.*, 2016a). Cabe destacar que las bacterias que habitan ecosistemas marinos expresan enzimas extracelulares que fundamentalmente se hallan asociados a la pared celular bacteriana (Reintjes *et al.*, 2017), si bien la relevancia ecológica de estos enzimas no ha sido esclarecida aún. En la rizosfera – un ecosistema altamente competitivo en términos de adquisición de nutrientes –, aquellas bacterias que han desarrollado estrategias nutricionales eficientes para competir con otros microorganismos son las que tienen una mayor probabilidad de supervivencia y serán las que se desarrollen y proliferen más fácilmente. Sin embargo, debe destacarse que la literatura sobre la localización de los enzimas extracelulares producidos por bacterias del suelo es prácticamente inexistente.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se plantea la hipótesis de que los enzimas asociados a la pared celular bacteriana sean responsables de una importante parte de la actividad enzimática total mostrada por bacterias que interactúan o ejercen un efecto sobre sus hospedadores vegetales, como es el caso de aquellas que habitan la rizosfera o endosfera de las raíces.

V.2. Diseño experimental

Dado que la comprensión del papel que las bacterias desempeñan en los procesos de descomposición de la materia orgánica aún se encuentra en sus comienzos y estos requieren ser más profundamente estudiados, se trató de caracterizar las 17 y

Resultados

44 cepas previamente aisladas de la endosfera radicular y rizosfera de *Q. pyrenaica*, respectivamente (Capítulo IV). Al objeto de estudiar el posible rol de las 61 cepas en el ecosistema forestal, y más concretamente la capacidad de las mismas de degradar la materia orgánica, se llevó a cabo una caracterización enzimática de las mismas. A su vez, teniendo en cuenta las implicaciones nutricionales que los diferentes tipos de enzimas extracelulares podrían tener, se trató de esclarecer la contribución en dichos procesos de los enzimas asociados a las células y excretados libremente. Ante la hipotética relevancia de los enzimas asociados a la pared celular, se planteó el diseño experimental que a continuación se detalla, y se siguió la metodología expuesta en el Apartado M.7.1. para poder contrastar la mencionada hipótesis.

Debido a la imposibilidad de analizar individualmente la actividad de los enzimas producidos por cada cepa bacteriana directamente en la endosfera radicular o la rizosfera, las 61 cepas en estudio fueron cultivadas en el medio líquido ME. Dicho medio fue seleccionado ya que contiene nutrientes de origen vegetal que son relevantes en el suelo, en la rizosfera y en la endosfera de las raíces, véanse ciertos oligosacáridos derivados de la celulosa y hemicelulosas (Paik *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 2014). Puesto que los polisacáridos de cadena larga son difícilmente separables de las células bacterianas y dificultan la detección y cuantificación de los enzimas asociados a la pared celular bacteriana, medios de cultivo que contuvieran polisacáridos muy complejos fueron descartados.

Todas las cepas fueron cultivadas individualmente y en triplicado bajo las condiciones especificadas en el Apartado M.7.1. Cuando las 61 cepas se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento, los cultivos fueron recuperados mezclando las tres réplicas correspondientes a cada cepa. Las mezclas compuestas fueron entonces fraccionadas obteniendo por un lado la denominada *fracción asociada a las células* o *fracción celular* (correspondiente al *pellet* celular y por lo tanto, fracción en la que estudiar los enzimas que se hallan adheridos o integrados en la pared celular bacteriana), y por otro, la *fracción libre de células*, referente al sobrenadante de los cultivos bacterianos en los que se hallaban los enzimas excretados extracelularmente.

El nivel de actividad de 12 enzimas relevantes en el reciclado y recambio de nutrientes fue evaluado cuantitativamente. Dado el alto contenido en carbohidratos de la rizosfera, se estudiaron varias polisacaridasas implicadas en la transformación de compuestos de origen vegetal, como la celulosa y diferentes tipos de hemicelulosas, incluyendo enzimas responsables de la desestructuración de las ramificaciones de dichos biopolímeros. Adicionalmente, en el ensayo se incluyeron otras hidrolasas implicadas también en el ciclo del C como lipasas, así como otros enzimas que participan en el ciclo del N y P (quitinasa y fostasa ácida, respectivamente). En la Tabla M.29 se pueden consultar los detalles de cada enzima.

La cuantificación de la actividad de cada uno de los enzimas en cada una de las fracciones fue realizada mediante un ensayo fluorimétrico basado en el fluoróforo MUF. Dicho ensayo fue realizado siguiendo la metodología detallada en el Apartado M.7.1. En líneas generales, el ensayo fluorimétrico se basó en cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida al excitar a una determinada longitud de onda el fluoróforo MUF libre, generado tras la actividad de los enzimas correspondientes sobre sus sustratos marcados. La medida de la actividad enzimática fue realizada mediante comparación de

la intensidad de fluorescencia registrada, con aquella determinada para una muestra patrón de concentración conocida del fluoróforo MUF libre. Así pues, en última instancia la actividad enzimática fue expresada en unidades de concentración de MUF libre detectado por unidad de tiempo y por volumen del cultivo bacteriano. El límite de detección fue $10 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, considerando todos los valores inferiores como ausencia de actividad.

Cabe destacar que para que los resultados obtenidos para las dos fracciones fueran comparables, se seleccionaron condiciones de pH y temperatura concretas que resultan en una cinética de reacción bioquímicamente bien definida. Así pues, se procedió a comparar la fracción libre y asociada a las células (en cuanto a la actividad de cada enzima se refiere) para cada una de las colecciones bacterianas en estudio. Puesto que cada colección se encontraba formada por múltiples cepas, la comparación de ambas fracciones fue realizada teniendo en cuenta el valor promedio de actividad de las tres réplicas técnicas correspondientes a cada cepa, de todas las cepas activas enzimáticamente que constituyen la correspondiente colección bacteriana. Esto es, para cada género bacteriano y en cada una de las fracciones se obtuvo un único valor promedio de actividad y desviación estándar de cada enzima. Cabe destacar que la comparación estadística de la actividad detectada en cada fracción fue realizada mediante el test no paramétrico Mann-Whitney U, tras descartar la distribución normal y homocedasticidad de los datos, y a un nivel de confianza del 95% (Apartado M.9.3.1.). A su vez, debe puntualizarse que tan solo fue posible realizar dichas comparaciones en el caso de que los enzimas resultaran activos para dos o más cepas y en ambas fracciones.

Una vez estudiada comparativamente la relevancia de cada una de las localizaciones enzimáticas, para cada una de las 61 cepas en estudio se calculó la actividad total de cada uno de los enzimas expresados. Para ello, se tuvo en cuenta la contribución de ambas fracciones, sumando por tanto para cada enzima la actividad registrada en sendas fracciones. Debe mencionarse que en el caso de querer indicar el porcentaje de actividad detectado en cada fracción con respecto a la actividad total (para cada una de las cepas bacterianas estudiadas), este fue calculado en base a la Ecuación 9.

$$\text{Actividad Enzima}_f^i (\%) = \frac{\text{Actividad Enzima}_f}{\text{Actividad total Enzima}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

Siendo f la fracción concreta (libre o asociada a las células) e i cada cepa de la colección bacteriana correspondiente. Cabe destacar que en el caso de querer expresar porcentualmente la actividad registrada en cada fracción para cada colección de cepas en estudio, esta fue calculada en base a la Ecuación 10.

$$\text{Actividad Enzima}_f^c (\%) = \frac{\sum_{i=1}^N \text{Actividad Enzima}_f}{\sum_{i=1}^N \text{Actividad total Enzima}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde N es el número de cepas que componen cada una de las colecciones c de cepas bacterianas en estudio (*Luteibacter*, *Pseudomonas*).

A su vez, el perfil de actividad enzimática de cada cepa fue analizado mediante la construcción de un *heatmap* o mapa de calor y la consiguiente agrupación jerárquica

Resultados

aglomerativa de los perfiles obtenidos. Para ello, se calcularon las distancias euclídeas entre los mismos, y estos fueron agrupados empleando el método de *clustering* o agrupación UPGMA.

V.3. Resultados

V.3.1. Comparación de la actividad de los enzimas excretados y los asociados a las células

Las 44 cepas adscritas al género *Pseudomonas* y las 17 correspondientes al género *Luteibacter*, aisladas de la rizosfera y endosfera radicular de *Q. pyrenaica*, respectivamente (Capítulo IV), fueron caracterizadas enzimáticamente.

En el caso del género *Luteibacter*, todos los enzimas fueron detectados en al menos una fracción excepto la β -glucuronidasa, la cual no fue producida por ninguna cepa en cantidades detectables en ninguna de las fracciones estudiadas (Figura V.1, Tabla V.1). En líneas generales, la mayor parte de la actividad enzimática fue medida en la fracción celular: siete enzimas fueron detectados exclusivamente asociados a las células y más de un 97.6% de la actividad total de la fosfatasa ácida, la β -manosidasa y la β -glucosidasa relativa a la colección completa de cepas del género *Luteibacter* correspondía a dicha fracción (Tabla V.1). A pesar de que la fosfatasa ácida fue excretada al medio extracelular por todas las cepas pertenecientes a este género, aquellas que mostraron mayor valor de actividad de dicho enzima en la fracción libre de células incluso exhibieron más de un 95% de la actividad total de la fosfatasa ácida en la fracción celular (Tabla V.2). Es de remarcar que para aquellos enzimas que resultaron activos tanto asociados a la pared celular como en el sobrenadante para al menos dos cepas (β -glucosidasa, fosfatasa ácida y lipasa), la actividad registrada en la fracción celular resultó significativamente superior a la detectada en la fracción libre de células (test Mann-Whitney U, p-valores < 0.028; Tabla V.1).

Tabla V.1. Actividad de los enzimas asociados a la pared celular y excretados libremente producidos por las cepas pertenecientes a la colección de *Luteibacter* y *Pseudomonas* aisladas de la endosfera radicular y rizosfera de *Q. pyrenaica*, respectivamente. Los valores indican, para cada enzima, la actividad promedio de todas las cepas productoras pertenecientes a cada uno de los géneros correspondientes (en el caso de ser detectados para dos o más cepas) \pm desviación estándar. La actividad enzimática se encuentra expresada en $\text{nM}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Los guiones indican que la actividad cuantificada se hallaba por debajo del límite de detección. Los asteriscos denotan que el enzima fue detectado tan solo para una cepa, la cual se especifica entre paréntesis. Para cada género bacteriano, las diferencias significativas en la actividad enzimática detectada entre ambas fracciones fueron calculadas mediante el test Mann-Whitney U a un nivel de confianza del 95%.

Enzimas ^a	<i>Luteibacter</i>			<i>Pseudomonas</i>		
	Fracción celular ^b	Fracción libre ^c	p-valor	Fracción celular ^b	Fracción libre ^c	p-valor
bG	4152 \pm 250	17 \pm 9	0.028	203 \pm 297	104 \pm 95	0.216
FA	5240 \pm 364	128 \pm 58	7·10 ⁻⁷	2729 \pm 2105	1172 \pm 1300	8·10 ⁻⁶
Lip	5415 \pm 343	3134 \pm 468	7·10 ⁻⁷	5451 \pm 907	3287 \pm 1235	9·10 ⁻¹²
bM	874 \pm 149	10* (L50)		12* (p23)	42 \pm 44	
aA	26 \pm 6	-		-	44 \pm 68	
bX	104 \pm 14	-		30 \pm 12	43 \pm 46	0.896
bGal	1163 \pm 195	-		-	42 \pm 54	
CBH	130 \pm 24	-		30* (p23)	44 \pm 47	
aG	594 \pm 230	-		10* (p20)	39 \pm 44	
QTN	11 \pm 1	-		-	44 \pm 52	
aGal	587 \pm 92	-		-	124 \pm 243	
bGlu	-	-		-	41 \pm 41	

^a *bG*, β -glucosidasa; *FA*, fosfatasa ácida; *Lip*, lipasa; *bM*, β -manosidasa; *aA*, α -arabinosidasa; *bX*, β -xilosidasa; *bGal*, β -galactosidasa; *CBH*, celobiohidrolasa; *aG*, α -glucosidasa; *QTN*, quitinasa; *aGal*, α -galactosidasa; *bGlu*, β -glucuronidasa.

^b *Fracción celular*, fracción correspondiente a los enzimas asociados a la pared celular bacteriana.

^c *Fracción libre*, fracción correspondiente a los enzimas excretados al medio líquido.

Resultados

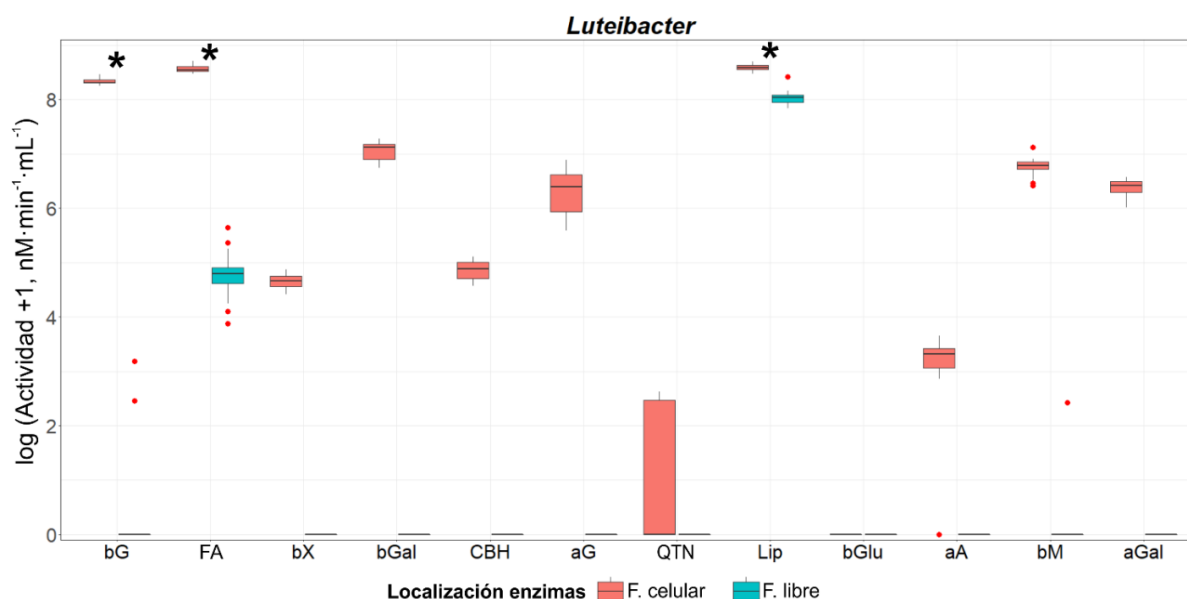


Figura V.1. Actividad de los enzimas asociados a la pared celular y excretados libremente, de todas las cepas de la colección correspondiente al género *Luteibacter*. Los diagramas de tipo *Box & Whisker* se representan en el estilo Tukey, donde los bigotes representan el primer y tercer cuartil y las líneas horizontales del interior de las cajas, la mediana de la actividad de cada enzima. Los puntos rojos corresponden al valor promedio de las tres réplicas relativas a una misma cepa que exceden 1.5 veces el intervalo intercuartílico. Los asteriscos denotan que la actividad de los enzimas es significativamente diferente en ambas fracciones consideradas, en aquellos casos en los que los enzimas fueron producidos por dos o más cepas, en ambas fracciones (test Mann-Whitney U, nivel de confianza del 95%). *F. celular*, fracción celular o de enzimas asociados a la pared celular bacteriana; *F. libre*, fracción libre de células o de enzimas excretados libremente al medio circundante. *bG*, β -glucosidasa; *FA*, fosfatasa ácida; *bX*, β -xilosidasa; *bGal*, β -galactosidasa; *CBH*, celobiohidrolasa; *aG*, α -glucosidasa; *QTN*, quitinasa; *Lip*, lipasa; *bGlu*, β -glucuronidasa; *aA*, α -arabinosidasa; *bM*, β -manosidasa; *aGal*, α -galactosidasa. Todos los datos de actividad fueron transformados logarítmicamente para una mayor claridad de la representación gráfica, ajustándose a una misma escala.

Por el contrario, la estrategia de utilización de enzimas (localización enzimática) de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* no fue tan definida como la observada en el caso de la colección de *Luteibacter*. Por un lado, la actividad de cinco de los 12 enzimas estudiados fue detectada exclusivamente en el sobrenadante de los cultivos de las 44 cepas, concretamente los enzimas β -galactosidasa, quitinasa, β -glucuronidasa, α -arabinosidasa y α -galactosidasa (Figura V.2; Tabla V.1). La β -xilosidasa, exocelulasa, α -glucosidasa y β -manosidasa resultaron activas en ambas fracciones tan solo en el caso de algunas cepas. Cabe destacar, que en dichos casos la actividad determinada en la fracción asociada a las células fue considerablemente baja; como máximo, un 57% de la actividad total de la β -xilosidasa fue medida en la fracción celular en el caso de la cepa p24 (Tabla V.3). Por otro lado, tomando en conjunto todas las cepas productoras de enzimas activos en ambas fracciones, se pudieron apreciar diferencias significativas entre la actividad de los enzimas asociados a la pared celular y aquellos liberados al medio extracelular. Dichas diferencias tan solo fueron observadas para la fosfatasa ácida y la lipasa (test Mann-Whitney U, p-

valores $< 8 \cdot 10^{-6}$), siendo los títulos de actividad superiores, en ambos casos, en la fracción asociada a las células (Tabla V.1).

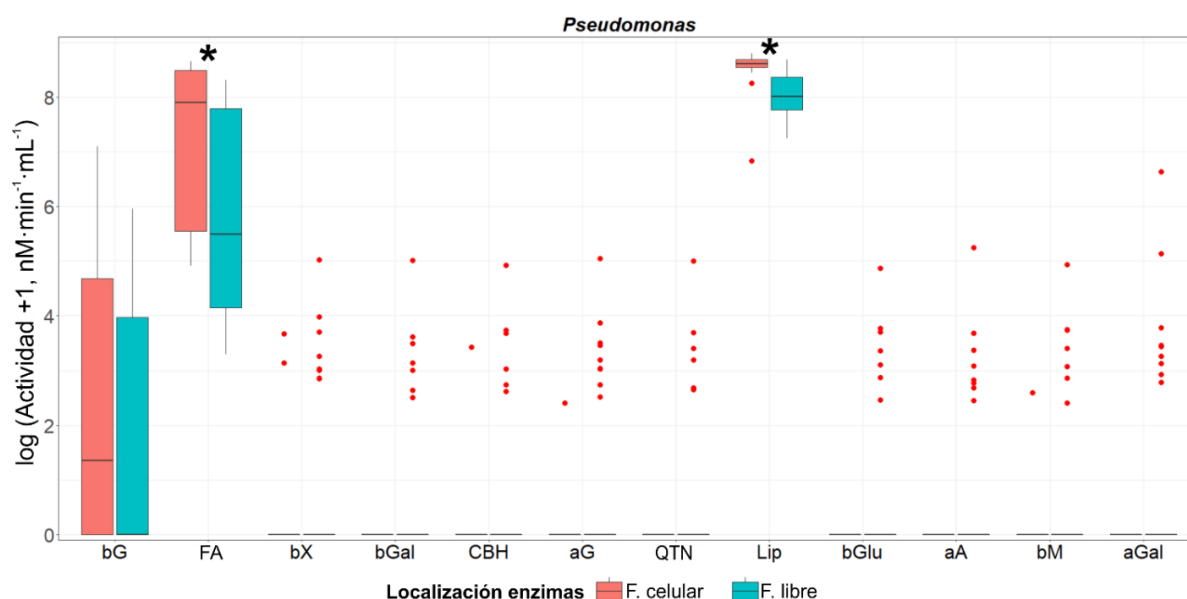


Figura V.2. Actividad de los enzimas asociados a la pared celular y excretados libremente, de todas las cepas de la colección correspondiente al género *Pseudomonas*. Los diagramas de tipo *Box & Whisker* se representan en el estilo Tukey, donde los bigotes representan el primer y tercer cuartil y las líneas horizontales del interior de las cajas, la mediana de la actividad de cada enzima. Los puntos rojos corresponden con el valor promedio de las tres réplicas relativas a una misma cepa que exceden 1.5 veces el intervalo intercuartílico. Los asteriscos denotan que la actividad de los enzimas es significativamente diferente en ambas fracciones consideradas, en aquellos casos en los que los enzimas fueron producidos por dos o más cepas, en ambas fracciones (test Mann-Whitney U, nivel de confianza del 95%). *F. celular*, fracción celular o de enzimas asociados a la pared celular bacteriana; *F. libre*, fracción libre de células o de enzimas excretados libremente al medio circundante. *bG*, β -glucosidasa; *FA*, fosfatasa ácida; *bX*, β -xilosidasa; *bGal*, β -galactosidasa; *CBH*, celobiohidrolasa; *aG*, α -glucosidasa; *QTN*, quitinasa; *Lip*, lipasa; *bGlu*, β -glucuronidasa; *aA*, α -arabinosidasa; *bM*, β -manosidasa; *aGal*, α -galactosidasa. Todos los datos de actividad fueron transformados logarítmicamente para una mayor claridad de la representación gráfica, ajustándose a una misma escala.

V.3.2. Potencial de las cepas aisladas de producir de enzimas implicados en la descomposición de la materia orgánica

Dada la contribución – en mayor o menor medida – de ambas fracciones en el caso de los dos géneros en estudio, el análisis de los perfiles enzimáticos fue realizado teniendo en cuenta ambas fracciones, esto es, considerando la actividad total.

Ninguna de las cepas del género *Luteibacter* fue capaz de producir β -glucuronidasa y tan solo seis produjeron el enzima quitinasa; sin embargo los diez enzimas restantes fueron expresados por más del 94% de las cepas de esta colección (Figura V.3A). La habilidad de las cepas aisladas de la endosfera de la raíz de roble melojo de producir enzimas implicados en la degradación de la materia orgánica fue considerable. Tal es así, que la cepa L14 fue capaz de producir el menor número de enzimas activos en las condiciones ensayadas, sintetizando el 75% de los enzimas estudiados. La proporción media de enzimas producidos de la colección de *Luteibacter* de aproximadamente un 86%.

A)

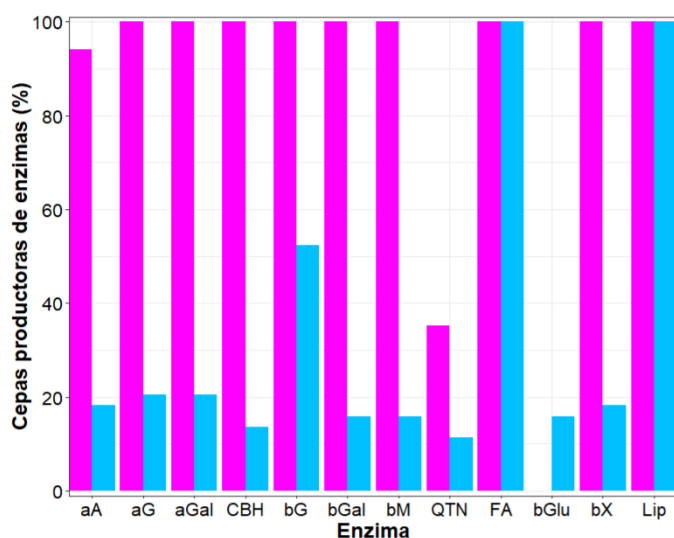
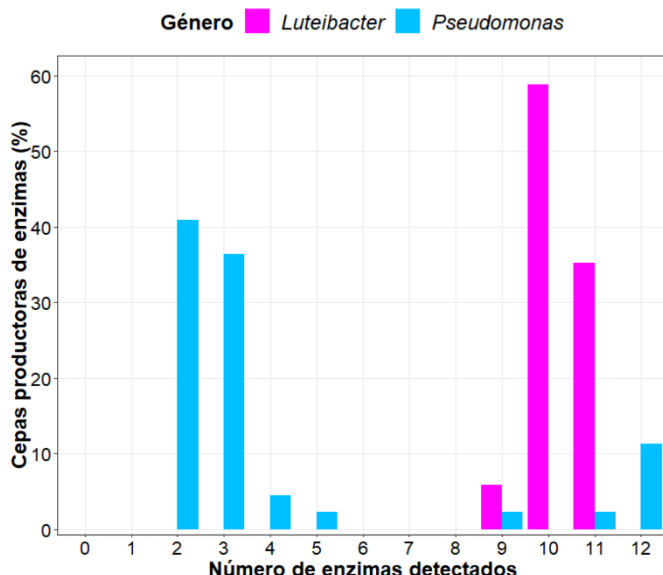


Figura V.3. Potencial enzimático de las cepas aisladas de la endosfera de la raíz y de la rizosfera de *Q. pyrenaica*, pertenecientes a los géneros *Luteibacter* y *Pseudomonas*, respectivamente. A) Porcentaje de cepas para las cuales se detectó la actividad de los diferentes enzimas hidrolíticos ensayados.

B)



B) Distribución de la cantidad de enzimas que fueron detectados para las cepas correspondientes a ambas colecciones bacterianas. aA, α -arabinosidasa; aG, α -glucosidasa; aGal, α -galactosidasa; CBH, celobiohidrolasa; bG, β -glucosidasa; bGal, β -galactosidasa; bM, β -manosidasa; QTN: quitinasa; FA, fosfatasa ácida; bGlu, β -glucuronidasa; bX, β -xilosidasa; Lip, lipasa. Los datos se refieren a la detección de los enzimas en la fracción asociada a las células, en la fracción libre de células, o en ambas.

Al contrario de lo observado para la colección correspondiente al género *Luteibacter*, todas las cepas adscritas al género *Pseudomonas* fueron capaces de producir al menos dos enzimas, encontrándose el promedio de enzimas detectados próximo al 33%. Cabe destacar que tan solo unas pocas cepas contribuyeron a la síntesis de un amplio intervalo de enzimas: únicamente ocho de las 44 cepas de esta colección resultaron productoras de más de cuatro de los 12 enzimas ensayados (Figura V.3B). En efecto, tan solo para las cepas p20, p23, p34, p49 y p54 fue posible detectar la actividad de todos los enzimas considerados, exhibiendo por ende el rango más amplio y diverso de enzimas sintetizados, no solo para esta colección, sino en el conjunto de las 61 cepas estudiadas (Figura V.4). A pesar de ello, las cinco cepas mencionadas mostraron valores relativamente bajos de la actividad de la inmensa mayoría de los enzimas, excepto para la lipasa, la fosfatasa ácida, y la β -glucosidasa de algunas cepas (Tabla V.3).

Capítulo V

Tabla V.2. Actividad de los enzimas asociados a las células, de los enzimas excretados al medio extracelular y actividad total de las cepas pertenecientes al género *Luteibacter*. Para cada enzima, los datos representan los valores promedio de actividad de las tres réplicas correspondientes a cada cepa \pm desviación estándar, así como el porcentaje de actividad calculado para cada localización enzimática, según la Ecuación 9. *F. celular*, Fracción celular (Fracción asociada a las células); *F. libre*, Fracción libre (Fracción libre de células). *bG*, β -glucosidasa; *FA*, fosfatasa ácida; *Lip*, lipasa; *bM*, β -manosidasa; *aA*, α -arabinosidasa; *bX*, β -xilosidasa; *bGal*, β -galactosidasa; *CBH*, celobiohidrolasa; *aG*, α -glucosidasa; *QTN*: quitinasa; *aGal*, α -galactosidasa; *bGlu*, β -glucuronidasa. Los guiones indican que la actividad registrada se encontraba por debajo del límite de detección.

L1				L3				L5			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	3905 ± 88	100	-	bG	3832 ± 109	100	-	bG	4030 ± 147	100	-
FA	5208 ± 141	97	3	FA	5013 ± 168	97	3	FA	5202 ± 201	98	2
Lip	7823 ± 354	64	36	Lip	8021 ± 59	60	40	Lip	8312 ± 53	61	39
bM	675 ± 113	100	-	bM	848 ± 69	100	-	bM	825 ± 37	100	-
aA	16 ± 1	100	-	aA	28 ± 1	100	-	aA	31 ± 1	100	-
bX	82 ± 5	100	-	bX	105 ± 7	100	-	bX	104 ± 9	100	-
bGal	910 ± 23	100	-	bGal	1174 ± 27	100	-	bGal	1286 ± 50	100	-
CBH	98 ± 5	100	-	CBH	131 ± 4	100	-	CBH	146 ± 8	100	-
aG	377 ± 51	100	-	aG	600 ± 82	100	-	aG	977 ± 128	100	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	11 ± 1	100	-
aGal	421 ± 6	100	-	aGal	564 ± 4	100	-	aGal	634 ± 5	100	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			83.3	Enzimas producidos (%)			83.3	Enzimas producidos (%)			91.7

Resultados

L6				L7				L8			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	4123 ± 293	100	-	bG	4039 ± 214	100	-	bG	4042 ± 125	100	-
FA	5030 ± 272	99	1	FA	5668 ± 224	98	2	FA	5110 ± 89	98	2
Lip	8794 ± 201	61	39	Lip	10,003 ± 61	54	46	Lip	8643 ± 173	64	36
bM	943 ± 137	100	-	bM	880 ± 72	100	-	bM	905 ± 56	100	-
aA	29 ± 1	100	-	aA	32 ± 1	100	-	aA	27 ± 2	100	-
bX	110 ± 12	100	-	bX	107 ± 10	100	-	bX	115 ± 10	100	-
bGal	1274 ± 56	100	-	bGal	1349 ± 89	100	-	bGal	1239 ± 53	100	-
CBH	146 ± 10	100	-	CBH	157 ± 13	100	-	CBH	145 ± 8	100	-
aG	875 ± 123	100	-	aG	965 ± 113	100	-	aG	619 ± 49	100	-
QTN	-	-	-	QTN	11 ± 1	100	-	QTN	-	-	-
aGal	639 ± 8	100	-	aGal	619 ± 14	100	-	aGal	610 ± 1	100	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			83.3	Enzimas producidos (%)			91.7	Enzimas producidos (%)			83.3
L9				L10				L12			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	4397 ± 209	100	-	bG	4466 ± 158	100	-	bG	4031 ± 86	100	-
FA	5462 ± 216	98	2	FA	5316 ± 153	98	2	FA	4988 ± 51	97	3
Lip	8847 ± 72	66	34	Lip	8701 ± 111	64	36	Lip	8160 ± 94	63	37
bM	951 ± 79	100	-	bM	1002 ± 102	100	-	bM	877 ± 126	100	-
aA	30 ± 1	100	-	aA	29 ± 0	100	-	aA	21 ± 1	100	-
bX	126 ± 17	100	-	bX	129 ± 16	100	-	bX	96 ± 8	100	-
bGal	1302 ± 77	100	-	bGal	1277 ± 71	100	-	bGal	986 ± 41	100	-
CBH	156 ± 14	100	-	CBH	157 ± 14	100	-	CBH	117 ± 6	100	-
aG	738 ± 146	100	-	aG	747 ± 113	100	-	aG	477 ± 88	100	-
QTN	11 ± 3	100	-	QTN	13 ± 1	100	-	QTN	-	-	-
aGal	659 ± 7	100	-	aGal	671 ± 4	100	-	aGal	554 ± 4	100	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			91.7	Enzimas producidos (%)			91.7	Enzimas producidos (%)			83.3

Capítulo V

L13				L14				L15			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	4004 ± 58	100	-	bG	4743 ± 168	99	1	bG	3856 ± 38	99	1
FA	4883 ± 17	98	2	FA	6305 ± 165	97	3	FA	5267 ± 89	95	5
Lip	7757 ± 235	67	33	Lip	8741 ± 45	66	34	Lip	8574 ± 159	59	41
bM	850 ± 111	100	-	bM	1238 ± 162	100	-	bM	610 ± 54	100	-
aA	22 ± 1	100	-	aA	-	-	-	aA	18 ± 2	100	-
bX	94 ± 8	100	-	bX	82 ± 7	100	-	bX	91 ± 7	100	-
bGal	955 ± 30	100	-	bGal	1329 ± 48	100	-	bGal	848 ± 14	100	-
CBH	110 ± 6	100	-	CBH	116 ± 11	100	-	CBH	96 ± 4	100	-
aG	446 ± 83	100	-	aG	611 ± 34	100	-	aG	267 ± 29	100	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	543 ± 8	100	-	aGal	716 ± 13	100	-	aGal	409 ± 9	100	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			83.3	Enzimas producidos (%)			75	Enzimas producidos (%)			83.3
L18				L20				L21			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	4141 ± 90	100	-	bG	4151 ± 88	100	-	bG	4535 ± 225	100	-
FA	5245 ± 30	99	1	FA	5140 ± 52	99	1	FA	5932 ± 169	97	3
Lip	8037 ± 190	66	34	Lip	7971 ± 217	67	33	Lip	9078 ± 129	66	34
bM	798 ± 102	100	-	bM	640 ± 65	100	-	bM	991 ± 84	100	-
aA	20 ± 2	100	-	aA	19 ± 1	100	-	aA	32 ± 1	100	-
bX	98 ± 10	100	-	bX	94 ± 9	100	-	bX	121 ± 16	100	-
bGal	990 ± 40	100	-	bGal	893 ± 52	100	-	bGal	1407. ± 77	100	-
CBH	107 ± 6	100	-	CBH	103 ± 9	100	-	CBH	164 ± 9	100	-
aG	363 ± 55	100	-	aG	339 ± 73	100	-	aG	831 ± 276	100	-
QTN	-	-	-	QTN	10 ± 1	100	-	QTN	-	-	-
aGal	512 ± 4	100	-	aGal	460 ± 0	100	-	aGal	687 ± 7	100	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			83.3	Enzimas producidos (%)			91.7	Enzimas producidos (%)			83.3

Resultados

L22				L50			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	4032 ± 149	100	-	bG	4297 ± 184	100	-
FA	5647 ± 81	97	3	FA	5839 ± 91	98	2
Lip	8729 ± 174	68	32	Lip	9143 ± 68	62	38
bM	884 ± 55	100	-	bM	959 ± 49	99	1
aA	25 ± 1	100	-	aA	38 ± 0	100	-
bX	96 ± 11	100	-	bX	118 ± 7	100	-
bGal	1115 ± 55	100	-	bGal	1442 ± 49	100	-
CBH	116 ± 10	100	-	CBH	149 ± 19	100	-
aG	329 ± 78	100	-	aG	541 ± 2	100	-
QTN	-	-	-	QTN	11 ± 3	100	-
aGal	605 ± 2	100	-	aGal	668 ± 4	100	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			83.3	Enzimas producidos (%)			91.7

Capítulo V

Tabla V.3. Actividad de los enzimas asociados a las células, de los enzimas excretados al medio extracelular y actividad total de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Para cada enzima, los datos representan los valores promedio de actividad de las tres réplicas correspondientes a cada cepa \pm desviación estándar, así como el porcentaje de actividad calculado para cada localización enzimática, según la Ecuación 9. *F. celular*, Fracción celular (Fracción asociada a las células); *F. libre*, Fracción libre (Fracción libre de células). *bG*, β -glucosidasa; *FA*, fosfatasa ácida; *Lip*, lipasa; *bM*, β -manosidasa; *aA*, α -arabinosidasa; *bX*, β -xilosidasa; *bGal*, β -galactosidasa; *CBH*, celobiohidrolasa; *aG*, α -glucosidasa; *QTN*: quitinasa; *aGal*, α -galactosidasa; *bGlu*, β -glucuronidasa. Los guiones indican que la actividad registrada se encontraba por debajo del límite de detección.

p1				p2				p3			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	327 \pm 4	75	25	bG	-	-	-	bG	302 \pm 3	53	47
FA	7242 \pm 108	58	42	FA	4970 \pm 149	97	3	FA	5750 \pm 88	52	48
Lip	7880 \pm 105	68	32	Lip	8213 \pm 81	64	36	Lip	8846 \pm 100	67	33
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	15 \pm 1	-	100.00	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25

Resultados

p4				p7				p9			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	125 ± 4	11	89	bG	-	-	-	bG	94 ± 6	61	39
FA	2297 ± 65.	17	83	FA	1647 ± 77	94	6	FA	3521 ± 157	65	35
Lip	2938 ± 278	32	68	Lip	8681 ± 117	58	42	Lip	9614 ± 141	68	32
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	17 ± 3	-	100
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	14 ± 1	-	100
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	16 ± 3	-	100
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	13 ± 3	-	100
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	13 ± 1	-	100
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	20 ± 3	-	100
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	760 ± 22	-	100	aGal	-	-	-	aGal	22 ± 1	-	100
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	17 ± 2	-	100
Enzimas producidos (%)			33.3	Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			91.7
p10				p11				p12			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	46 ± 2	100	-	bG	160 ± 4	56	44	bG	132 ± 2	58	42
FA	6566 ± 138	58	42	FA	6440 ± 94	37	63	FA	5134 ± 148	40	60
Lip	10,838 ± 355	53	47	Lip	10,667 ± 361	53	47	Lip	8715 ± 108	57	43
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25

Capítulo V

p13				p14				p15			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	51 ± 3	100	-	bG	141 ± 5	74	26
FA	276 ± 28	89	11	FA	6683 ± 215	61	39	FA	4375 ± 199	78	22
Lip	7327 ± 522	75	25	Lip	10,544 ± 617	55	45	Lip	8101 ± 529	75	25
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25
p16				p17				p18			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	289 ± 9	49	51	bG	-	-	-	bG	153 ± 45	83	17
FA	7558 ± 281	55	45	FA	261 ± 17	74	26	FA	7055 ± 355	76	24
Lip	9078 ± 509	68	32	Lip	10,518 ± 273	55	45	Lip	7990 ± 108	82	18
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	10 ± 5	-	100
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	15 ± 4	-	100
bX	-	-	-	bX	19 ± 12	-	100	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	11 ± 1	-	100
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	20 ± 20	-	100	aG	15 ± 1	-	100
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	18 ± 2	-	100
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	11 ± 1	-	100
Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			33.3	Enzimas producidos (%)			75

Resultados

p19				p20				p23			
Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)		F. celular (%)	F. libre (%)	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)		F. celular (%)	F. libre (%)	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)		F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	1306 ± 27	71	29	bG	1449 ± 26	84	16
FA	1862 ± 55	96	4	FA	8874 ± 127	63	37	FA	5676 ± 37	92	8
Lip	8333 ± 157	62	38	Lip	8768 ± 325	67	33	Lip	7270 ± 431	72	28
bM	-	-	-	bM	41 ± 5	-	100	bM	150 ± 8	8	92
aA	-	-	-	aA	39 ± 2	-	100	aA	210 ± 9	-	100
bX	-	-	-	bX	91 ± 6	42	58	bX	151 ± 15	-	100
bGal	-	-	-	bGal	36 ± 3	-	100	bGal	164 ± 0	-	100
CBH	-	-	-	CBH	41 ± 3	-	100	CBH	167 ± 25	18	82
aG	-	-	-	aG	57 ± 4	18	82	aG	154 ± 28	-	100
QTN	-	-	-	QTN	39 ± 1	-	100	QTN	148 ± 23	-	100
aGal	-	-	-	aGal	43 ± 1	-	100	aGal	169 ± 7	-	100
bGlu	-	-	-	bGlu	42 ± 1	-	100	bGlu	130 ± 11	-	100
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			100	Enzimas producidos (%)			100
p24				p25				p30			
Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)		F. celular (%)	F. libre (%)	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)		F. celular (%)	F. libre (%)	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)		F. celular (%)	F. libre (%)
bG	602 ± 31	67	33	bG	-	-	-	bG	-	-	-
FA	8586 ± 231	67	33	FA	175 ± 7	77	23	FA	210 ± 12	83	17
Lip	10,074 ± 104	66	34	Lip	9245 ± 179	53	47	Lip	9038 ± 166	52	48
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	39 ± 3	57	43	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	11 ± 3	-	100	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			41.7	Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			16.7

Capítulo V

p31				p33				p34			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	-	-	-	bG	194 ± 9	81	19
FA	234 ± 6	75	25	FA	262 ± 7	76	24	FA	5852 ± 134	87	13
Lip	10,589 ± 350	46	54	Lip	8217 ± 106	66	34	Lip	8680 ± 65	75	25
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	21 ± 3	-	100
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	16 ± 3	-	100
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	20 ± 4	-	100
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	19 ± 1	-	100
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	14 ± 1	-	100
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	23 ± 2	-	100
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	14 ± 3	-	100
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	25 ± 6	-	100
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	21 ± 5	-	100
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			100
p36				p37				p42			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	-	-	-	bG	-	-	-
FA	274 ± 11	82	18	FA	209 ± 16	82	18	FA	287 ± 16	90	10
Lip	9420 ± 130	56	44	Lip	8519 ± 485	55	45	Lip	8321 ± 176	69	31
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			16.7

Resultados

p43				p44				p45			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	-	-	-	bG	-	-	-
FA	430 ± 27	88	12	FA	313 ± 15	74	26	FA	343 ± 19	75	25
Lip	10,696 ± 152	56	44	Lip	10,587 ± 360	49	51	Lip	8891 ± 274	66	34
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			16.7
p47				p48				p49			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	226 ± 9	77	23	bG	-	-	-	bG	99 ± 3	47	53
FA	6384 ± 132	63	37	FA	327 ± 17	77	23	FA	6534 ± 72	76	24
Lip	8911 ± 107	66	34	Lip	11,059 ± 232	46	54	Lip	9598 ± 175	67	33
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	41 ± 9	-	100
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	28 ± 2	-	100
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	40 ± 2	-	100
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	32 ± 4	-	100
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	39 ± 5	-	100
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	32 ± 4	-	100
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	29 ± 4	-	100
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	30 ± 7	-	100
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	39 ± 2	-	100
Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			100

Capítulo V

p50				p51				p52			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	335 ± 9	50	50	bG	59 ± 5	100	-	bG	113 ± 11	100	-
FA	8027 ± 253	63	37	FA	6769 ± 128	76	24	FA	7756 ± 174	72	28
Lip	8534 ± 169	71	29	Lip	6985 ± 47	73	27	Lip	7292 ± 193	80	20
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25
p53				p54				p55			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	21 ± 3	-	100	bG	-	-	-
FA	4719 ± 217	98	2	FA	5460 ± 106	98	2	FA	2468 ± 332	99	1
Lip	8094 ± 365	66	34	Lip	7650 ± 241	80	20	Lip	7899 ± 468	66	34
bM	-	-	-	bM	29 ± 3	-	100	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	21 ± 3	-	100	aA	-	-	-
bX	-	-	-	bX	25 ± 1	-	100	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	22 ± 3	-	100	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	20 ± 3	-	100	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	31 ± 2	-	100	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	23 ± 2	-	100	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	31 ± 3	-	100	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	28 ± 4	-	100	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			100	Enzimas producidos (%)			16.7

Resultados

p56				p57				p60			
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)
bG	-	-	-	bG	46 ± 7	63	37	bG	-	-	-
FA	253 ± 16	90	10	FA	4855 ± 154	42	58	FA	5468 ± 258	98	2
Lip	9641 ± 616	51	49	Lip	7765 ± 86	50	50	Lip	6737 ± 697	77	23
bM	-	-	-	bM	-	-	-	bM	-	-	-
aA	-	-	-	aA	-	-	-	aA	11 ± 4	-	100
bX	-	-	-	bX	-	-	-	bX	-	-	-
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-	bGal	-	-	-
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-	CBH	-	-	-
aG	-	-	-	aG	-	-	-	aG	-	-	-
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-	QTN	-	-	-
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-	aGal	-	-	-
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			25	Enzimas producidos (%)			25
p61				p62							
	Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)		Actividad total (nM · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F. celular (%)	F. libre (%)				
bG	-	-	-	bG	55 ± 1	100	-				
FA	3688 ± 199	99	1	FA	5583 ± 90	69	31				
Lip	9970 ± 641	56	44	Lip	7709 ± 345	75	25				
bM	-	-	-	bM	-	-	-				
aA	-	-	-	aA	-	-	-				
bX	-	-	-	bX	-	-	-				
bGal	-	-	-	bGal	-	-	-				
CBH	-	-	-	CBH	-	-	-				
aG	-	-	-	aG	-	-	-				
QTN	-	-	-	QTN	-	-	-				
aGal	-	-	-	aGal	-	-	-				
bGlu	-	-	-	bGlu	-	-	-				
Enzimas producidos (%)			16.7	Enzimas producidos (%)			25				

Si bien seis cepas pertenecientes al género *Luteibacter* resultaron productoras de quitina, la actividad total de este enzima se encontró próxima al límite de detección en todos los casos. En este sentido, un nivel de actividad promedio considerablemente bajo fue detectado para la α -arabinosidasa, aunque este enzima fue comúnmente expresado por las cepas pertenecientes a esta colección (Tabla V.2). Por el contrario, a excepción del enzima mencionado, otros enzimas involucrados en la descomposición de las hemicelulosas (β -galactosidasa y β -manosidasa) así como la celobiohidrolasa (degradadora de celulosa) fueron producidos por todas las cepas del género *Luteibacter*, registrándose valores de actividad elevados (Tabla V.2). A su vez, fueron la lipasa, fosfatasa ácida y la β -glucosidasa los tres enzimas para los cuales se registró un mayor valor promedio de actividad, tal y como ocurrió para las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Cabe destacar que el enzima β -glucosidasa fue más raramente detectado entre las cepas aisladas de la rizosfera de roble melojo, siendo producidas por aproximadamente el 50% de las mismas. La α -arabinosidasa, exocelulasa, β -galactosidasa, β -manosidasa, quitinasa, β -glucuronidasa y β -xilosidasa fueron sintetizadas por menos del 20% de las cepas que formaban parte de la colección correspondiente al género *Pseudomonas* (Figura V.3B), y además, la actividad de dichos enzimas fue considerablemente baja para la mayoría de dichas cepas (Figura V.4; Tabla V.3).

Debe remarcarse el común alto valor promedio de actividad detectado para los enzimas lipasa y fosfatasa ácida de las cepas pertenecientes a los géneros *Luteibacter* y *Pseudomonas* (8549 y 8737 $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, Figura V.4). Ambos enzimas fueron, a su vez, detectados para las 61 cepas bacterianas en estudio.

Por otro lado, debe mencionarse que las cepas pertenecientes al mismo género mostraron perfiles enzimáticos similares entre sí, pero diferentes a los de las cepas de la otra colección, lo cual se vio reflejado en los dos grandes *clusters* formados en el dendrograma de la Figura V.4. Las cepas p23, p49, p20, p34 y p54 fueron la excepción a esta observación, resultando más similares a las cepas de la colección de *Luteibacter* que al resto de sus congéneres, en cuanto a los enzimas producidos y la actividad de los mismos.



Figura V.4. Perfiles enzimáticos de las cepas pertenecientes a los géneros *Luteibacter* y *Pseudomonas*. Los datos representan, para cada enzima, la actividad total promedio de las tres réplicas correspondientes a cada cepa. El *clustering* fue realizado mediante el algoritmo UPGMA y en base a distancias euclídeas. FA, fosfatasa ácida; Lip, lipasa; bGlu, β-glucuronidasa; QTN, quitinasa; bG, β-glucosidasa; aA, α-arabinosidasa; bX, β-xilosidasa; CBH, celobiohidrolasa; aGal, α-galactosidasa; bM, β-manosidasa; aG, α-glucosidasa; bGal, β-galactosidasa. Los datos de actividad fueron transformados logarítmicamente para una mayor claridad de la representación gráfica, quedando ajustados a la misma escala.

V.4. Discusión

Gran cantidad de esfuerzo ha sido realizado en el pasado al objeto de obtener una percepción más amplia de las funciones de los microorganismos en los ecosistemas forestales, especialmente en cuanto a las comunidades fúngicas se refiere (van den Brink *et al.*, 2011; van der Wal *et al.*, 2013; Eichlerová *et al.*, 2015). Sin embargo, una cantidad inferior de trabajos han sido encauzados hacia el estudio de los procesos que

son mediados por las bacterias del suelo, y más concretamente por los enzimas asociados a las paredes celulares de las mismas.

Por lo tanto, el posible papel de las 61 cepas asociadas a las raíces de *Q. pyrenaica* en diferentes procesos ecosistémicos fue evaluado mediante caracterización enzimática de las mismas. Para ello, se cuantificó la actividad de enzimas extracelulares (asociados a las células parentales y excretados libremente) frecuentemente implicados en el ciclo del C, N y P. El grueso de la actividad enzimática de la colección de cepas adscritas al género *Luteibacter* fue registrada en la fracción celular (en promedio, cerca del 96.5% de la actividad total, considerando todos los enzimas). A pesar de que el porcentaje medio de la actividad de los enzimas asociados a la pared de las células era inferior en el caso de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, este tampoco fue despreciable (19.6% de la actividad total). Así pues, dichos resultados confirmaron la principal hipótesis del estudio, demostrando la contribución de la fracción enzimática asociada a las células de las bacterias analizadas. Aunque la actividad de los enzimas asociados a las células fue fundamentalmente detectada para las cepas aisladas de la endosfera de las raíces de roble melojo (cepas correspondientes al género *Luteibacter*) y no tanto así para aquellas rizosféricas (*Pseudomonas* spp.), con el diseño experimental seguido no es posible concluir si el patrón de utilización de enzimas observado es explicado por el origen de las cepas en estudio (rizosfera o endosfera de raíces), o si se trata de un fenómeno típico de taxones bacterianos concretos. Cabe destacar que otros autores han observado diferentes perfiles de enzimas extracelulares entre distintas especies pertenecientes incluso al mismo género, concretamente en los casos de *Sphingomonas* y *Burkholderia* (Lladó *et al.*, 2016), por lo que no es de extrañar observar diferentes estrategias de utilización de enzimas incluso entre diferentes géneros.

Independientemente de los perfiles enzimáticos específicos de cada taxón, con los resultados obtenidos fue posible determinar que obviando la fracción de enzimas asociados a la pared celular bacteriana (como tradicionalmente se ha procedido en la mayoría de estudios), la contribución total de determinadas cepas a la degradación de la materia orgánica puede verse subestimada, y en ciertos casos (como en el de la colección de cepas del género *Luteibacter*), en gran medida.

En el caso de los enzimas asociados a la superficie celular, es probable que los productos de degradación de los sustratos permanezcan en las proximidades de las células productoras de dichos enzimas, reduciéndose de esta manera las pérdidas difusionales de los nutrientes. A su vez, disminuyendo la difusión de los productos de hidrólisis es posible atenuar la intercepción o el acaparamiento de los mismos por parte de otros microorganismos, por ejemplo, de aquellos que no son capaces de producir enzimas extracelulares (frecuentemente conocidos como microorganismos *cheater*) (Allison, 2005). Consecuentemente, la adhesión o integración de los enzimas en la pared celular bacteriana podría hacer que la síntesis enzimática se tradujera en un proceso energéticamente más rentable y podría representar una estrategia nutricional eficiente. Además de las implicaciones nutricionales que este tipo de enzimas podrían tener, el hecho de que la actividad enzimática tenga lugar en las proximidades de las bacterias productoras resultaría en un efecto localizado o dirigido sobre sus hospedadores vegetales. En el caso de bacterias endofíticas que sintetizan enzimas

Resultados

que actúan descomponiendo la biomasa vegetal, la asociación de los mismos a la pared celular bacteriana supone una restricción de la degradación generalizada de las raíces del hospedador. De esta manera es posible evitar la destrucción extendida de los tejidos vegetales permitiendo la penetración de las bacterias al interior del hospedador ocasionando el menor daño posible al mismo (Robledo *et al.*, 2008).

Resulta dificultoso imaginar la magnitud de la fracción enzimática asociada a la pared celular de otros taxones bacterianos, bacterias con diferentes estilos de vida, o incluso de otros grupos de microorganismos, debido a la gran escasez de datos al respecto. El hecho de que previamente se hayan detectado niveles altos de actividad de enzimas que son liberados al medio en cultivos de algunas bacterias celulolíticas (López-Mondéjar *et al.*, 2016a, 2016b) sugiere que la relevancia de los enzimas excretados puede ser considerable. Por ejemplo, López-Mondéjar y colaboradores (2016a) señalaron que la cepa *Paenibacillus* O199 aislada de suelo (la cual degrada la celulosa cristalina de una manera muy eficiente), libera extracelularmente celulasas y diversas hemicelulasas, así como una gran cantidad de proteínas no catalíticas de unión al sustrato (SBP, *Substrate Binding Proteins*) que se unen a una considerable variedad de sacáridos que componen la pared celular vegetal. A pesar de que el papel de las SBP es aún desconocido, los autores sugieren que la eficiencia hidrolítica de la cepa *Paenibacillus* O199 podría encontrarse parcialmente explicada por la unión de las mismas a la celulosa, prerequisite para la degradación de dicho polímero. Así pues, el desarrollo de mecanismos celulares destinados a la degradación de los polisacáridos vegetales no necesariamente en las proximidades de las células sugiere que dicha localización no es en absoluto despreciable.

Por otro lado, Lladó y colaboradores (2016) observaron niveles bajos de actividad enzimática cuando bacterias pertenecientes al *phylum Proteobacteria* aisladas de un suelo forestal fueron cultivadas en medio líquido. Ello podría ser debido a la baja capacidad de síntesis enzimática y/o actividad propia de los enzimas, o a la asociación de los mismos a la pared celular de las bacterias, la cual no fue tomada en cuenta en el mencionado estudio. En el caso de hongos filamentosos que son capaces de cubrir con su micelio los sustratos ya descompuestos y así asegurar la captura de los productos liberados tras la acción de enzimas difusibles, es común detectar altos niveles de actividad de enzimas excretados en cultivos líquidos (Baldrian *et al.*, 2011). Sin embargo, cabe destacar que existen ciertas evidencias de que una parte de la actividad total de los enzimas se encuentra vinculada al micelio (Valášková y Baldrian, 2006), si bien el papel fisiológico de dicha asociación permanece desconocido. Por otro lado, los resultados obtenidos para levaduras típicas de suelos forestales demuestran que la mayoría de su actividad enzimática se halla asociada a las células (Mašinová *et al.*, 2018). Dada su naturaleza unicelular, la asociación de los enzimas a la superficie celular le podría conferir a las levaduras las mismas ventajas anteriormente mencionadas que a las bacterias, esto es, reducción de las pérdidas de los nutrientes por difusión. Así pues, aun tomando todas las evidencias en consideración, y pese a los posibles desempeños sugeridos, resulta difícil conocer el papel ecológico de cada una de las localizaciones específicas de los enzimas.

La actividad de aquellos enzimas implicados en la descomposición de polisacáridos como celulosa o hemicelulosa fue detectada casi exclusivamente

asociada a la pared celular en aquellas cepas pertenecientes al género *Luteibacter*. Tan solo tres cepas expresaron la β -manosidasa y/o la β -glucosidasa en la fracción libre de células, y la actividad de ambas enzimas en dicha fracción fue residual. Cabe destacar que estas observaciones no resultaron sorprendentes ya que previamente se ha revisado que las polisacaridasas son enzimas que se hallan con frecuencia asociados a la pared celular (Burns, 1982). Los microorganismos han desarrollado a lo largo de la evolución diversos sistemas que les permiten unir o retener polisacáridos, véanse los módulos de unión a carbohidratos (CBM, *Carbohydrate Binding Modules*) contenidos en celulasas y hemicelulasas, así como las estructuras tipo pili IV. Estas últimas participan en la adhesión de las células bacterianas a la celulosa, por ejemplo en el caso de especies pertenecientes a los géneros *Fibrobacter* y *Ruminococcus* (Suen *et al.*, 2011; Vodovnik *et al.*, 2013). La misma apreciación ha sido documentada para una cepa celulolítica adscrita al género *Luteibacter* aislada de la hojarasca de un bosque dominado por la quercínea *Q. petraea* (López-Mondéjar *et al.*, 2016b). Además del pili tipo IV, estos autores describieron la presencia en el proteoma de aquella cepa de glicosil hidrolasas que contienen CBMs. Así pues, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo así como las comentadas adaptaciones destinadas a mantener los sustratos en la proximidad celular, se podría especular que diversas cepas del género *Luteibacter* han desarrollado evolutivamente diferentes estrategias para mejorar la captura de nutrientes, por ejemplo, reduciendo el reparto de los nutrientes con otras bacterias o microorganismos. Debe remarcarse que la presencia de productos de la descomposición de la materia orgánica generados tras la actividad de enzimas liberados extracelularmente, puede atraer a otras bacterias, tal y como ocurre en el caso de la existencia de heridas en las raíces (Hallmann *et al.*, 1997). Por lo tanto, la actividad de los enzimas asociados a la pared celular detectada en el caso de las bacterias aisladas de la endosfera radicular, podría suponer una adaptación desarrollada por las mismas para evitar la atracción de otros competidores al punto de entrada de las raíces. Igualmente, podría implicar una actividad localizada en las raíces del hospedador resultando en un perjuicio menor para el mismo. Sin embargo, la relevancia de los enzimas asociados a la pared celular producidos por dichas cepas debería ser estudiada en un futuro para arrojar más luz sobre su fisiología y ecología.

Además de las polisacaridasas, otras hidrolasas como la lipasa o la fosfatasa ácida fueron considerablemente activas en la fracción asociada a las células para las 61 cepas estudiadas. Dicha localización de ambas enzimas ha sido previamente registrada para microorganismos filogenéticamente muy distantes, como es el caso de los géneros bacterianos *Burkholderia* (*phylum Proteobacteria*) (Shu *et al.*, 2016) y *Clostridium* (*phylum Firmicutes*) (Reilly *et al.*, 2009) e incluso levaduras aisladas de suelos forestales (Mašinová *et al.*, 2018).

La localización de los enzimas relativa a las células productoras no es algo estable sino variable en determinados casos. Las cepas pertenecientes a la colección de *Pseudomonas* no mostraron una estrategia de utilización de enzimas tan definida como en el caso de las cepas del género *Luteibacter*. Así, la actividad de algunos enzimas como la β -glucosidasa, lipasa o fosfata ácida fue considerablemente alta en la fracción asociada a las células, representando más del 62% de la actividad total (Tabla V.2). Sin embargo, la actividad relativa a los enzimas excretados al medio extracelular osciló entre el 29.5 y el 100% de la actividad total registrada, según el enzima

Resultados

considerado. Aunque ya ha sido demostrado previamente que la actividad de los enzimas asociados a la pared celular puede suponer una gran parte de la actividad enzimática total en ecosistemas acuáticos, la significación de los enzimas difusibles es generalmente conocida por ser muy variable (Traving *et al.*, 2015). Algunos autores aseguran que la contribución de los enzimas excretados depende de diferentes factores ambientales e incluso de los diferentes sustratos (Vrba *et al.*, 1992; Keith y Arnosti, 2001), mientras otros remarcan que la localización de los enzimas hidrolíticos puede variar a lo largo del tiempo o en función del enzima considerado (Burns, 1982), tal y como se observó en este trabajo. Aunque la actividad de los enzimas excretados puede suponer la difusión y dilución de los productos generados respecto a las bacterias productoras, otros microorganismos pueden sacar partido de dicha situación. Los denominados *cheaters* pueden captar los productos solubles, resultando la expresión de dichos enzimas beneficiosa a nivel comunitario. Así, la capacidad de producir enzimas activos en el medio circundante observada para múltiples cepas de la colección de *Pseudomonas* sugiere que estas podrían tener una relación sintrófica con otros microorganismos en la rizosfera de roble melojo. Sin embargo, con las evidencias obtenidas no es posible definir el papel específico de estas cepas ni la relevancia de dicha localización enzimática.

Tradicionalmente la localización específica de los enzimas con respecto a la célula productora ha sido ignorada en la inmensa mayoría de los estudios en los que se analizaban los enzimas extracelulares producidos por bacterias del suelo. Sin embargo, en el presente caso su estudio ha permitido analizar la contribución de algunas bacterias para las cuales tan solo se detectó la actividad de enzimas asociados a la pared celular, especialmente en el caso de las cepas pertenecientes al género *Luteibacter*. Tradicionalmente se hubiera considerado que el potencial degradador de las mismas era nulo o escaso, dado que dichos enzimas no hubieran sido analizados. Sin embargo, mediante el estudio de ambas localizaciones y haciendo énfasis en la históricamente ignorada localización enzimática, fue posible determinar la potencial implicación de las 61 cepas en el recambio de C, N y P. En líneas generales, la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* mostraron un rango moderado de hidrolasas activas (siendo la actividad de alguna de ellas relativamente baja), lo cual indica que la mayor parte de la colección correspondiente a dicho género podría tener una capacidad de contribuir a un número de procesos limitado, y en mayor o menor medida.

La degradación efectiva de la celulosa depende de la actividad de varios enzimas: β -1,4-endoglucanasas que escinden internamente la celulosa de forma aleatoria, exocelulasa (celobiohidrolasa) que actúa sobre los extremos de los polisacáridos liberando celobiosa, y la β -glucosidasa, la cual conduce a la obtención de glucosa a partir del disacárido, siendo las dos últimas las fundamentales (Koeck *et al.*, 2014; Rytioja *et al.*, 2014). Koeck y colaboradores (2014) defienden que las bacterias *realmente celulolíticas* (las que son capaces de hidrolizar la celulosa cristalina) son aquellas que albergan en su genoma genes que codifican β -glucosidasas junto con otros implicados en la síntesis de endo- y exocelulasas. Muchas de las bacterias documentadas en la literatura como celulolíticas son capaces de producir generalmente solo endoglucanasas que hidrolizan enlaces glucosídicos de sustratos artificiales basados en celulosa (*e.g.*, CMC) con los que no necesariamente se demuestra la actividad β -glucosidasa ni celobiohidrolasa (Koeck *et al.*, 2014). Sin embargo, en el

presente trabajo la cepa p23 (género *Pseudomonas*) y todas las cepas adscritas al género *Luteibacter* exhibieron un elevado nivel de actividad no solo del enzima β -glucosidasa, sino también de la exocelulasa, la cual cataliza el paso limitante de la degradación de la celulosa. Así pues, a falta del estudio de la producción de enzimas de tipo endoglucanasa en cultivo líquido, estos resultados supondrían un indicio de que las mencionadas cepas podrían ser descomponedoras *reales* de celulosa. Sin embargo, para poder realizar tal afirmación debería comprobarse la capacidad de degradar celulosa cristalina.

Berlemont y Martiny (2013) demostraron mediante el análisis de un gran número de genomas bacterianos que los genes codificantes de exo-, endocelulasas y β -glucosidasas se hallan distribuidos en un 24% del total de genomas que analizaron, y podría por tanto tratarse de potenciales bacterias celulolíticas. Por el contrario, en la mayoría de los casos (56%) tan solo fue posible detectar genes que codifican β -glucosidasas, en cuanto a la degradación de la celulosa se refiere. Dichos autores basaron sus apreciaciones en estudios genómicos y análisis bioinformáticos, siendo por lo tanto esperable que el porcentaje de bacterias productoras de dichos enzimas sea inferior. En este caso, la proporción de cepas para las cuales se detectó la actividad de la β -glucosidasa tan solo alcanzó aproximadamente la mitad del valor previsto (29.5%), probablemente debido a que la presencia de un gen en un genoma no necesariamente implica su expresión. En relación al proceso de descomposición de la celulosa, aquellas bacterias oportunistas que tan solo son capaces de sintetizar el enzima β -glucosidasa, generalmente son consideradas como *cheaters* ya que podrían utilizar como sustrato la celobiosa generada tras la actividad de otros microorganismos productores de exocelulasas (Allison, 2005; Berlemont y Martiny, 2013). Así pues, los resultados obtenidos sugieren que todas las cepas correspondientes a la colección de *Luteibacter* y algunas de las cepas adscritas al género *Pseudomonas* podrían ser bacterias celulolíticas, bien actuando como degradadoras reales, o bien como oportunistas.

Aunque el género *Luteibacter* no se encuentra completamente caracterizado en la actualidad y algunos autores han demostrado que cepas aisladas de un liquen terrestre no son ni tan siquiera capaces de sintetizar β -glucosidasa (Sigurbjörnsdóttir y Vilhemsson, 2016), recientemente una cepa aislada de un suelo forestal ha sido clasificada como celulolítica (López-Mondejar *et al.*, 2016a). Estos autores informaron sobre la habilidad de la misma de degradar también hemicelulosa y detectaron en su proteoma diferentes proteínas implicadas en su degradación. Tal y como se muestra en la Tabla V.2, las cepas adscritas al género *Luteibacter* resultaron productoras de hemicelulasas de diferentes tipos (especialmente β -manosidasa y β -galactosidasa), encontrándose por tanto estas aportaciones en línea con las realizadas por López-Mondéjar y colaboradores (2016a). Es de mencionar la riqueza de enzimas sintetizados por las cepas pertenecientes a esta colección, lo cual sugiere que no se trata de bacterias especializadas en un único proceso degradativo. Dichos enzimas diferentes pero complementarios en cuanto a su función, podrían actuar sinérgicamente y contribuir todos ellos de forma conjunta a una eficiente degradación de la pared celular vegetal. Enzimas extracelulares implicados en dicho proceso (por ejemplo, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas, poligalacturonasas, amilasas) son comúnmente sintetizados por bacterias de naturaleza endofítica para poder penetrar en los tejidos vegetales (Carrim *et al.*, 2006; Naveed *et al.*, 2014). Este fenómeno ha sido ya

Resultados

previamente documentado para bacterias aisladas de la endosfera de la raíz de plantas del algodón e incluso de árboles típicos de manglares (Hallmann *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2014). Por tanto, no sería de extrañar que la expresión de celulasas y hemicelulasas registrada para las cepas de la colección de *Luteibacter* se hallara relacionada con el origen endofítico de dichas cepas. Sin embargo, con el diseño experimental y los resultados obtenidos en este trabajo no es posible clarificar el papel concreto de los enzimas sintetizados por dichas bacterias.

Las 61 cepas estudiadas en este trabajo fueron capaces de producir el enzima fosfatasa ácida. Conforme mostraron Bergkemper y colaboradores (2016), bacterias filogenéticamente diversas se encuentran frecuentemente involucradas en el recambio del P en suelos de bosques templados, entre las cuales el orden *Xhantomonadales* (al cual pertenece el género *Luteibacter*) dominó la expresión del mencionado enzima. Lladó y colaboradores (2016) a su vez detectaron altos niveles de actividad de la fosfatasa ácida en el caso de cepas pertenecientes a diferentes *phyla* aisladas de un bosque de coníferas. Por otro lado, varias especies del género *Pseudomonas* son ya conocidas por su implicación en la liberación de fosfato en una amplia variedad de suelos agrícolas, quedando así reflejada la teórica relevancia de estos taxones en el ciclo biogeoquímico del P.

Igualmente, el enzima lipasa fue detectado para todas las cepas en estudio. Los lípidos son componentes esenciales de la biomasa microbiana y como tal ya es conocido que cepas adscritas a ambos géneros bacterianos son capaces de producir el enzima que cataliza la hidrólisis de los mismos (Kojima y Shimizu, 2003; Bresciani *et al.*, 2014). Concretamente, en los suelos forestales la actividad del enzima lipasa es frecuentemente elevada (Brabcová *et al.*, 2018), obteniendo de esta manera un indicio más del potencial que las cepas pertenecientes a los géneros *Luteibacter* y *Pseudomonas* podrían tener para degradar en el ecosistema forestal diferentes constituyentes de la materia orgánica.

Tradicionalmente, los enzimas adheridos a la pared celular han sido raramente estudiados con detalle en el caso de bacterias del suelo. Tal y como se demuestra en este trabajo, la actividad de los enzimas asociados a la superficie celular y que se hallan implicados en la descomposición de la materia orgánica puede suponer una considerable parte de la actividad enzimática extracelular total. Tal es así que para algunas cepas la actividad de los enzimas tan solo pudo ser detectada en la fracción asociada a las células. Por tanto, se concluye que midiendo exclusivamente la actividad de los enzimas excretados extracelularmente (tal y como tradicionalmente se han llevado a cabo este tipo de abordajes) el potencial enzimático total de ciertas bacterias asociadas a las raíces de sus hospedadores puede verse subestimado. Por lo tanto, se sugiere tomar en consideración en ensayos futuros la fracción asociada a las células, de tal forma que la posible implicación bacteriana en los ciclos biogeoquímicos mediada por los enzimas extracelulares pueda ser definida de una forma más completa y por tanto más real. Mediante el estudio de ambos tipos de localizaciones enzimáticas fue posible describir el potencial celulolítico y hemicelulolítico de las cepas endosféricas pertenecientes al género *Luteibacter*, mientras que el potencial descomponedor de la materia orgánica de aquellas aisladas de la rizosfera de roble melojo (*Pseudomonas*

spp.) pareció moderado. Los resultados obtenidos reflejaron por tanto, la posible diferente implicación de las cepas en estudio en el reciclado o recambio de C, N y P.

V.5. Perspectivas futuras

El estudio comparativo de la actividad de los enzimas extracelulares en ambas localizaciones permitió describir la capacidad de las 61 cepas de degradar determinados sustratos de una forma más completa a la habitualmente descrita. Si bien en determinados casos no pudo ser detectada la actividad de ciertos enzimas en alguna (o ninguna) de las fracciones, no necesariamente debe asumirse que las cepas en estudio no son capaces de sintetizar dichos enzimas, pues en dichos casos estos podrían no ser activos o encontrarse su nivel de actividad por debajo del límite de detección. Así pues, no es descartable que en caso de variar las condiciones experimentales los perfiles enzimáticos registrados sean diferentes. En este sentido, debe matizarse que los ensayos fueron realizados con sustratos modificados (marcados con el fluoróforo MUF) y no con los sustratos reales de los enzimas, por lo que una inferencia más certera sobre la capacidad de las cepas bacterianas de degradar la materia orgánica requeriría la utilización de sustratos tales como celulosa cristalina o diferentes tipos de hemicelulosas, entre otros. En este contexto, debe tenerse en cuenta también que la actividad de los enzimas fue ensayada en cultivos líquidos, cuando las 61 cepas se hallaban en la misma fase de crecimiento, y cuantificando la actividad a temperatura y pH concretos, condiciones que distan de las típicamente encontradas en la rizosfera y en el interior de la raíz. Por ello, los resultados de actividad enzimática aquí mostrados deben considerarse como el potencial o la capacidad que las cepas tienen de producir tales enzimas bajo las condiciones experimentales fijadas.

En aras de reflejar las condiciones ambientales típicas de la rizosfera y del interior de la raíz en la mayor medida de lo posible, se podría intentar realizar los ensayos enzimáticos ajustando la temperatura de la reacción según la temperatura concreta del ecosistema en estudio, y mediante el empleo de una mezcla de reacción no tamponada. Sin embargo, tal y como apunta Baldrian (2009), ni tan siquiera de esta manera es posible simular totalmente las condiciones *in situ*, especialmente en lo que a la humedad del suelo y osmolalidad del mismo se refiere. La viabilidad del ajuste de tales condiciones experimentales así como la complejidad de ensayar la actividad descomponedora de cada una de las cepas *in situ*, hacen que sea difícil encontrar una alternativa factible a los ensayos realizados. En definitiva, los esfuerzos realizados reflejan el potencial de las cepas estudiadas sin que necesariamente represente la actividad que estas llevan a cabo en condiciones naturales, quedando por tanto planteada una nueva cuestión a ser abordada en experimentos futuros.

Si bien en el presente trabajo se estudiaron diferentes aspectos que contribuyen a tener una visión más amplia sobre la actividad enzimática de bacterias asociadas a especies leñosas, ensayos complementarios permitirían caracterizar más en detalle las cepas en estudio. Así pues, abordajes futuros podrían incluir experimentos con los que estudiar la versatilidad metabólica de las mencionadas cepas. Por ejemplo, mediante el sistema Biolog podría llevarse a cabo un análisis de qué diferentes sustratos son utilizados como fuente de C y energía por las mencionadas cepas, entre los que se podrían incluir mono-, di-, tri- y polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, aminas, amidas e incluso sustratos complejos (Lladó *et al.*, 2016; Mašinová *et al.*, 2018). Los

Resultados

resultados obtenidos a través de dicha aproximación permitirían conocer si las cepas en estudio son capaces de metabolizar los productos generados tras la actividad de los enzimas hidrolíticos aquí estudiados, obteniendo de esta manera una visión más profunda de los procesos relacionados con el recambio de nutrientes en la rizosfera y endosfera radicular. A su vez, comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los que pudieran obtenerse con el sistema Biolog, sería posible aclarar si algunas de las cepas con hipotético comportamiento *cheater* actuarían realmente como bacterias oportunistas.

Los abordajes realizados y sugeridos podrían verse acompañados de otros con los que caracterizar aún en mayor detalle el papel de las cepas en los procesos degradativos, así como comprobar si estas han desarrollado adaptaciones fisiológicas con las que participar en dichos procesos. Concretamente, mediante la implementación de estudios genómicos, transcriptómicos o preferentemente proteómicos sería posible en primer lugar determinar si aquellas cepas para las cuales no fue factible detectar la actividad de algunos enzimas realmente no son productoras o si por el contrario las condiciones ensayadas no resultaron las más adecuadas para la expresión de los mismos. Asimismo, en función del tipo de abordaje se podría analizar la existencia en el genoma o proteoma de las cepas en estudio de elementos relacionados con estructuras con las que acceder más fácilmente a los sustratos, tales como pili tipo IV, módulos CBM típicos de celulasas y hemicelulasas, proteínas de unión al sustrato, sistemas de secreción, celulosomas, entre otros. De esta manera sería posible plantear el posible papel u obtener una explicación de la estrategia de utilización de enzimas observada para las cepas de las diferentes colecciones bacterianas.

En relación a la localización y actividad de los enzimas extracelulares producidos por las cepas de los géneros *Luteibacter* y *Pseudomonas*, no es posible concluir que las tendencias observadas se deban al diferente origen de las mismas (endosfera de la raíz y rizosfera, respectivamente). Si bien en el caso de las cepas pertenecientes al género *Luteibacter* la mayor proporción y actividad registrada para los enzimas asociados a la pared celular podría verse explicada por su naturaleza endofítica, la ausencia de más representantes bacterianos endofíticos hace imposible realizar dicha asignación. Tampoco los perfiles enzimáticos observados pueden justificarse atendiendo exclusivamente a la taxonomía de las cepas en estudio. Con el objetivo de clarificar tales cuestiones, sería conveniente realizar ensayos en un futuro en los que se incluyera un mayor número de cepas, de origen filogenético diverso, tanto endofíticas como rizosféricas, y de diferente estrategia trófica (por ejemplo, bacterias oligotrofas y copiotrofas). Así, mediante la realización de un estudio más amplio en el que se compararan los enzimas producidos, la actividad y la localización específica de los mismos, sería posible esclarecer las posibles causas que conducen a la obtención de los perfiles enzimáticos observados.



CAPÍTULO VI

Caracterización fenotípica de dos colecciones de bacterias asociadas a la raíz de
Quercus pyrenaica

La imagen muestra los rizomorfos del basidiomiceto *Armillaria mellea*.

Fuente: Ana V. Lasa.

VI.1. Introducción

El valor paisajístico y ecológico de la frondosa *Quercus pyrenaica* en los ecosistemas de montaña, y especialmente en los bosques mediterráneos, hacen de esta una especie de gran relevancia a nivel mundial. Sin embargo, el área de distribución de dicha quercínea podría considerarse hoy día inversamente proporcional a su relevancia ecológica: en la actualidad su corología se resume prácticamente a la Península Ibérica, habiendo sido en el pasado una especie distribuida a lo largo de gran parte del Oeste europeo (Nieto Quintano *et al.*, 2016). A ello se une el acentuado estado de deterioro de las masas de roble melojo, su baja tasa de regeneración natural y su vulnerabilidad frente a determinados patógenos (ver Apartado 1.1.1.2.3.4.). Entre los organismos que ocasionan enfermedad a esta y otras quercíneas, destacan ciertos hongos como *Biscogniauxia mediterranea* y *Diplodia corticola*, dos ascomicetos que causan la aparición de chancros carbonosos y chancros del tronco y ramas (o *chancros de Diplodia*), respectivamente. Si bien afectan a individuos ya en decaimiento, contribuyen a acelerar el proceso, pudiendo ocasionar la muerte del árbol en última instancia, especialmente bajo condiciones de estrés hídrico como las que se asocian al cambio global (Moricca *et al.*, 2016). Por otro lado, es conocida la virulencia de un basidiomiceto como *Armillaria mellea* sobre quercíneas y un diverso rango de hospedadores, muchos de los cuales son de interés forestal. Se trata de un hongo que causa la muerte de los tejidos conductores desde el cuello de la raíz hasta que progresivamente tiene lugar el secado de las copas y la consiguiente muerte de los hospedadores. Otro tipo de patógenos vegetales como el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* afectan también a varias especies del género *Quercus*, ocasionando la podredumbre radical de especies leñosas, una de las principales enfermedades asociadas al síndrome de decaimiento o Seca, la cual está suponiendo la muerte de un gran número de pies especialmente en Andalucía (Romero *et al.*, 2005). Sin embargo, los métodos de control de dichos patógenos habitualmente son inefectivos y conllevan el uso de fungicidas químicos poco sostenibles para el medio ambiente.

Algunos autores defienden que los bosques son ecosistemas efectivos en cuanto a la captación de elementos minerales que se encuentran en la atmósfera, debido a la gran superficie del dosel arbóreo que los retiene. El agua de lluvia puede ser enriquecida en dichos elementos perdidos por lixiviación (Montalvo *et al.*, 1980), suponiendo por tanto un mecanismo ecológico que ha permitido que los árboles se desarrollen en suelos pobres. Este fenómeno ha sido igualmente descrito para *Q. pyrenaica*, sin embargo la deposición atmosférica relativa a un año no llega a satisfacer la necesidad arbórea anual de algunos nutrientes (Moreno Marcos y Gallardo Lancho, 2002). Aunque las deposiciones típicas de la atmósfera suponen en cierta medida un aporte nutricional para las plantas leñosas, son los microorganismos asociados a las raíces los que contribuyen de forma esencial a la nutrición y mejora del estado general de salud de las mismas (Berg *et al.*, 2017). La actividad de dichos microorganismos no solo supone en última instancia un aporte de elementos minerales, fitohormonas y otros compuestos (ver Apartado 2.2.2.2.1), sino que también puede considerarse como la primera barrera de defensa contra hongos fitopatógenos transmitidos por el suelo. Así pues, el aislamiento y caracterización de microorganismos adaptados al complejo nicho de la rizosfera o del interior de la raíz, con capacidad de promover el crecimiento vegetal y/o

antagonizar el desarrollo de hongos fitopatógenos, constituye una interesante estrategia con la que mejorar el *fitness* de las plantas.

Durante los últimos años, la utilización de PGPB y BCAs como reemplazo de fertilizantes químicos perjudiciales tanto para el medio ambiente como para la salud humana ha sido intensamente estudiada, siendo las especies agrícolas el principal foco de atención de todos los estudios (Bhattacharyya y Jha, 2012). Cabe destacar que a pesar de las dificultades inherentes a la realización de ensayos con PGPB y/o BCAs y especies arbóreas (debidas, por ejemplo, al largo ciclo vital de las mismas), existe cada vez un mayor interés por la implementación de esta tecnología en los viveros comerciales (Chanway, 1997; Lucas García *et al.*, 2004). Por un lado, la inoculación de plantones – bien de árboles de cultivo, bien de especies forestales – ha sido propuesta como estrategia para mejorar el vigor de los hospedadores, mejorando la supervivencia de los plantones cuando son trasplantados a campo (Lucas García *et al.*, 2004). Por otro lado, no debe menospreciarse la conveniencia de la implementación de esta tecnología como alternativa económicamente viable, respetuosa con el medio ambiente y de fácil aplicación en viveros (Vonderwell y Enebak).

Algunos autores han centrado sus trabajos en determinadas especies leñosas como manzano (Aslantaş *et al.*, 2007; Karlidag *et al.*, 2007), naranjo amargo (Kalai-Grami *et al.*, 2014), olivo (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a; 2018b), e incluso especies forestales entre las que se incluyen *Picea glauca*, *Pinus pinea*, *P. taeda*, *P. elliottii*, *P. palustris* (O'Neill *et al.*, 1992; Probanza *et al.*, 2002; Enebak, 2005; Barriuso *et al.*, 2008). La relación detallada de los trabajos más recientes realizados en este ámbito puede consultarse en la Tabla 1. Sin embargo, debe destacarse que el efecto de PGPB y/o BCAs sobre especies del género *Quercus*, y más concretamente sobre *Q. pyrenaica*, permanece prácticamente inexplorado.

Uno de los géneros bacterianos con mayor potencial beneficioso sobre las plantas, incluidas las especies arbóreas, es *Pseudomonas*. Diversos trabajos han demostrado que la interacción de bacterias adscritas a este género con sus hospedadores vegetales resulta en una mejora del estado de salud de los mismos, debido a la plasticidad metabólica que caracteriza a este género y al amplio espectro de metabolitos con influencia sobre el desarrollo y la protección vegetal que son capaces de sintetizar (Kamilova *et al.*, 2006; Agarar *et al.*, 2015; Mercado-Blanco, 2015). Los efectos beneficiosos de diferentes especies de este género también han sido documentados sobre plantas leñosas, bien en términos de mayor longitud de tallo, mayor cosecha de fruto o de protección frente a diferentes patógenos fúngicos (Gómez-Lama Cabanás *et al.* 2018a). En el caso concreto de la encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*), Lucas García y colaboradores (2004) demostraron que determinados parámetros como la altura o peso seco del tallo y el diámetro del cuello de raíz de plántulas de esta especie mejoraban cuando estas eran inoculadas con una cepa de la especie *P. fluorescens*.

A diferencia de lo que ocurre con *Pseudomonas*, pocos autores han estudiado en detalle el posible efecto de las especies del género *Luteibacter* sobre los hospedadores vegetales con los que interacciona. Algunos autores han demostrado su efecto beneficioso sobre gramíneas como cebada (*Hordeum vulgare*) (Guglielmetti *et al.*, 2013). Además, se dispone de ciertos indicios sobre el potencial de una cepa adscrita a la especie *L. rhizovicinus* de producir reguladores del crecimiento de plantas

arbóreas (Piagnani *et al.*, 2007). Sin embargo, tal y como ocurre en el caso del género *Pseudomonas*, no existen en la actualidad trabajos sobre la interacción de bacterias pertenecientes al género *Luteibacter* con la especie forestal *Q. pyrenaica*.

La información existente sobre muchos de los mecanismos que subyacen tras la interacción PGPB/BCA-especie arbórea es, en la actualidad, realmente escasa. Poco se conoce sobre la capacidad de los mismos de colonizar las raíces, la respuesta de los árboles a la inoculación bacteriana, la eficiencia de la inoculación en condiciones naturales o el impacto de factores ambientales sobre su eficiencia. Uno de los aspectos que permanecen menos estudiados es la idoneidad de la inoculación de especies arbóreas con consorcios microbianos. La utilización de diferentes especies microbianas en combinación o incluso de distintas cepas de una misma especie podría suponer ciertas ventajas frente al empleo de bioformulaciones basadas en un único tipo de organismo. Por ejemplo, aplicándose consorcios microbianos se podría cubrir una mayor diversidad de mecanismos promotores del crecimiento vegetal y de antibiosis, esperándose por tanto un efecto aditivo o bien sinérgico. A su vez, la introducción de diversos microorganismos beneficiosos, especialmente en el caso de los BCAs, puede suponer la colonización de diferentes microhábitas del entorno radicular, estimulando así la competición por la ocupación de los mismos con los organismos fitopatógenos (Sarma *et al.*, 2015; Gómez-Lama Cabanás *et al.* 2018b). Sin embargo y pese al potencial beneficio asociado al uso de consorcios microbianos, uno de los primeros pasos que se deben abordar de forma previa a su implementación es el estudio de la compatibilidad de los candidatos, siendo descartables aquellos microorganismos que muestren interacciones antagonicas entre sí (Singh *et al.*, 2013).

Las estrategias seguidas para el desarrollo de inoculantes basados en consorcios bacterianos generalmente conllevan una caracterización fenotípica de las cepas candidatas. Una vez estas han sido aisladas del nicho ecológico donde se pretende que ejerzan su función, debe estudiarse su potencial como PGPB y/o BCAs en base a propiedades metabólicas relacionadas con la estimulación, directa o indirecta, del crecimiento vegetal. Subsiguientes ensayos de compatibilidad entre las cepas seleccionadas deben ser llevados a cabo al objeto de estudiar las interacciones que tienen lugar entre las mismas. Descartado el antagonismo entre las cepas en estudio, es recomendable estudiar el efecto de la inoculación de las mismas sobre las plantas, así como conocer la capacidad de colonización de las raíces (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a).

VI.2. Diseño experimental

El hábitat concreto donde se pretende que las bacterias a inocular ejerzan su función, constituye uno los principales nichos diana de donde aislar posibles candidatos a incluir en las bioformulaciones, debido a que es esperable que estos sean capaces de adaptarse a las condiciones ambientales típicamente encontradas en dicho nicho. Por lo tanto, las 44 cepas aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica* (género *Pseudomonas*), y las 17 obtenidas del interior de la raíz de roble melojo correspondientes a la colección de *Luteibacter* (Capítulo IV) fueron caracterizadas fenotípicamente al objeto de conocer su potencial como PGPB y/o BCAs. Por otro lado, se estudió la tolerancia de las mismas a diferentes concentraciones de ácido tánico, compuesto con actividad antimicrobiana común en la corteza, hojas e incluso raíces de *Q. pyrenaica*.

Resultados

A tal fin, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* en medios de cultivo específicos que pusieron de manifiesto diferentes propiedades metabólicas de las cepas en estudio. Para lograr una caracterización en detalle se siguió el diseño experimental que se expone a continuación, siguiendo la metodología específica descrita en el Apartado M.6.6. Debe mencionarse que todos los ensayos fueron realizados tres veces salvo las excepciones que se indican. A su vez se incluyeron cepas previamente caracterizadas capaces de llevar cabo cada uno de los procesos o funciones estudiadas, para facilitar la interpretación de los resultados (controles positivos). Por el contrario, en todos los ensayos se empleó solución salina estéril como ejemplo de la ausencia de actividad (control negativo).

VI.2.1. Estudio de las propiedades asociadas a la promoción del crecimiento vegetal

El potencial para proporcionarle hierro a la planta fue evaluado indirectamente mediante la detección de la producción de sideróforos quelantes de este elemento. Para ello, las cepas adscritas al género *Pseudomonas* fueron crecidas en el medio CAS, siendo aquellas pertenecientes a la colección de *Luteibacter* estudiadas en dos sistemas modificados del mencionado medio, dada su incapacidad para crecer sobre el mismo (ver Apartado M.6.6.1.1.). Debe mencionarse que independientemente del sistema empleado, se seleccionó la cepa *Phyllobacterium endophyticum* PEPV15^T como control positivo (Tabla M.9).

La capacidad de solubilizar dos tipos distintos de fosfato cálcico fue evaluada conforme se detalla en el Apartado M.6.6.1.2. Concretamente, para las cepas aisladas de la rizosfera de roble melojo se empleó el medio NBRIP suplementado, individualmente, con CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. En el caso de la colección de cepas del género *Luteibacter*, la actividad solubilizadora fue evaluada en los medios ricos YED-P y YED-P doblemente modificado, ambos suplementados, individualmente, con las dos sales fosfóricas mencionadas. En ambos casos los resultados fueron cualitativamente comparados con los obtenidos para la cepa cepa solubilizadora *P. endophyticum* PEPV15^T (control positivo).

Por otro lado, se estudió la capacidad de las 61 cepas de producir reguladores del crecimiento. La síntesis de auxinas de tipo indólico por parte de las cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter* fue puesta de manifiesto en el medio mínimo DF y el medio YEM, respectivamente, suplementados ambos con el precursor de compuestos indólicos (L-triptófano). Debe puntualizarse que estas fueron crecidas paralelamente en dichos medios de cultivo en ausencia del aminoácido, al objeto de cuantificar la cantidad de compuestos indólicos producidos exclusivamente a partir del precursor. De esta manera se trató de descartar en última instancia la señal generada por otros componentes de naturaleza no indólica presentes en el medio de cultivo, o producidos como consecuencia del metabolismo bacteriano. Para ello, tras realizar la cuantificación de los compuestos indólicos producidos (mediante el método colorimétrico descrito en el Apartado M.6.6.2.1.), la concentración de equivalentes de IAA determinada en ausencia de L-triptófano fue sustraída a la correspondiente cuantificada en presencia del mencionado precursor. Debe puntualizarse que previamente en todos los casos se midió la DO_{600} de los cultivos con el objetivo de relativizar la concentración de los compuestos indólicos en función de la densidad

celular¹⁹. Por otro lado, se incluyeron tres réplicas técnicas por cada una de las tres réplicas biológicas en el análisis. El límite de detección fue 2 µg de equivalentes de IAA · mL⁻¹ · DO₆₀₀⁻¹, considerando todos los valores inferiores como ausencia de actividad.

La habilidad bacteriana de reducir los niveles de etileno (fitohormona implicada en la regulación del estrés vegetal) fue puesta de manifiesto indirectamente, determinando la capacidad de las cepas de producir el enzima ACC deaminasa que actúa sobre el precursor del etileno (ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxílico). Concretamente, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de N es el mencionado sustrato del enzima ACC deaminasa como medida indirecta de la síntesis de dicho enzima. Para ello se siguió el método descrito en el Apartado M.6.6.1.5., siendo el medio mínimo DF el medio de cultivo de elección. Al objeto de poder atribuir la posible incapacidad bacteriana de crecer en dicho medio de cultivo exclusivamente a la fuente de N en estudio, todas las cepas fueron crecidas en las mismas condiciones en el medio DF suplementado con su fuente habitual de N (Tabla M.16). En este caso, la cepa *Achromobacter* sp. VPTA3 fue utilizada como control positivo.

VI.2.2. Estudio de las propiedades asociadas al antagonismo de hongos y oomicetos fitopatógenos

Algunos mecanismos bacterianos relacionados con la protección de las plantas frente a hongos y oomicetos fitopatógenos fueron evaluados *in vitro*. En primer lugar, se valoró cualitativamente la capacidad de las 61 cepas en estudio de producir el enzima catalasa conforme se detalla en el Apartado M.6.6.1.6, empleando la cepa *Paenibacillus polymyxa* PIC73 (Tabla M.9) como control positivo de la producción del mismo.

La degradación de las proteínas que constituyen la pared celular fúngica es otro de los mecanismos frecuentemente estudiados a la hora de caracterizar potenciales BCAs. A tal fin, todas las cepas (incluida la cepa proteolítica *P. polymyxa* PIC73 empleada como referencia positiva) fueron crecidas en el medio SMA, conforme se detalla en el Apartado M.6.6.1.4.

Otro de los aspectos habitualmente analizados cuando se desea caracterizar o seleccionar posibles agentes de biocontrol es la capacidad de degradar celulosa. Las 61 cepas en análisis fueron crecidas en el medio CMC ya que este contiene una sal sódica de celulosa (carboximetilcelulosa) y es útil para poner de manifiesto la actividad de enzimas de tipo endoglucanasa. El ensayo fue realizado conforme se detalla en el Apartado M.6.6.1.3., utilizando para el revelado una solución de lugol. Debe

¹⁹ Los microorganismos productores de auxinas de tipo indólico tienen tendencia a liberar al medio extracelular ciertos intermediarios como indol-3-piruvato (IPA), indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrilo (IAN), ácido indol-3-láctico (ILA, *indole-3-lactic acid*), indol-3-acetaldehído (IAAld), entre otros, los cuales pueden ser igualmente detectados midiendo la DO₅₃₀, al igual que sucede en el caso del IAA (Goswami *et al.*, 2015). Por lo tanto, al tratarse de un método colorimétrico ciertamente inespecífico, no es posible cuantificar la cantidad exacta de IAA producido, sino del conjunto de compuestos indólicos generados. Así pues, los resultados reflejaron la concentración total de derivados indólicos, siendo expresados en unidades de concentración por unidades de densidad óptica de los cultivos bacterianos (µg de equivalentes de IAA · mL⁻¹ · DO₆₀₀⁻¹).

mencionarse que en este caso no se pudo incluir ninguna cepa conocida como control positivo de la producción de endoglucanasas.

VI.2.3. Estudio de la tolerancia y utilización de ácido tánico como fuente de carbono

Con el objetivo de lograr una caracterización completa de las cepas en estudio, se procedió a evaluar la tolerancia de las mismas a un compuesto con propiedades antimicrobianas característico de las hojas, corteza e incluso raíces de roble, esto es, el ácido tánico. A tal fin, se valoró, cualitativamente, la capacidad de las cepas de crecer en medio sólido en presencia de diferentes concentraciones del tanino (Apartado M.6.7.1.). A modo de control del crecimiento, las cepas fueron sembradas paralelamente en su medio habitual de crecimiento sin suplementación con ácido tánico. Debe mencionarse que en este caso no fue incluida ninguna cepa conocida como control positivo. Posteriormente, las cepas fueron inoculadas en el medio mínimo DF, incluyendo en este caso ácido tánico como fuente única de C. Todas fueron crecidas de forma paralela en medio DF con glucosa pero sin ácido tánico, con el objetivo de atribuir la posible ausencia de crecimiento a la fuente de C ensayada.

Cabe destacar que la evaluación de la capacidad de producir sideróforos, solubilizar fosfato inorgánico y la actividad proteolítica y endocelulolítica de las cepas fue realizada de forma semicuantitativa. En cada caso, se calculó un índice numérico de actividad conforme se detalla en el Apartado M.6.6.1.8., expresando así el potencial de cada cepa para actuar como PGPB. Por el contrario, la actividad de la catalasa y la capacidad de utilizar ACC y ácido tánico como fuentes de N y C, respectivamente, fueron determinadas cualitativamente.

VI.2.4. Ensayos *in vitro* de antagonismo bacteria-bacteria

Ante el creciente interés por desarrollar inoculantes basados en varias especies o cepas bacterianas, se caracterizaron las interacciones que *in vitro* tienen lugar entre las cepas en estudio, para lo cual se llevaron a cabo ensayos de enfrentamiento bacteria-bacteria tal y como se detalla en el Apartado M.6.6.1.7.1. Dado el elevado número de posibles combinaciones *target-challenger* a realizar, se seleccionó una cepa representativa de cada grupo RAPD (excepto p23, p62 y L13).

Los ensayos de enfrentamiento fueron realizados en el medio de cultivo rutinario de ambas colecciones bacterianas. Como control positivo del crecimiento, de manera paralela todas las cepas fueron sembradas individualmente en ambos medios de cultivo. Cabe destacar que las interacciones entre cepas fueron valoradas cualitativamente, atendiendo exclusivamente a las de tipo antagónico (ausencia de crecimiento de la cepa *target* alrededor de cada cepa *challenger*). Dado el elevado número de combinaciones *target-challenger*, este ensayo fue realizado por duplicado.

VI.2.5. Ensayos *in vitro* de antagonismo bacteria-oomiceto/hongos fitopatógenos

Uno de los motivos por los que la situación de las masas de roble melojo se considera preocupante es la susceptibilidad a ciertos hongos como *B. mediterranea*, *D. corticola*, *A. mellea* y al oomiceto *P. cinnamomi*. Así pues, siguiendo la metodología específica detallada en el Apartado 6.6.1.7.2., se estudió la capacidad de las 61 cepas en estudio para inhibir el crecimiento de los mencionados microorganismos mediante enfrentamiento a los mismos en los medios de cultivo rutinariamente empleados para el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos. En este caso, la cepa *P. polymyxa* PIC73 fue empleada como referencia positiva. Así pues, el desarrollo del micelio en las proximidades de las colonias bacterianas fue valorado visualmente, considerándose como cepas bacterianas inhibitorias aquellas alrededor de las cuales no se apreció desarrollo del micelio. Debe mencionarse que en el caso del basidiomiceto *A. mellea* también fue valorada la inhibición del crecimiento de los rizomorfos previamente formados a la siembra bacteriana, así como la inhibición de la aparición de nuevos rizomorfos.

VI.2.6. Estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre *Medicago sativa* L. 'Victoria' (alfalfa)

Ante el elevado número de cepas a analizar, se evaluó el efecto sobre el crecimiento vegetal de tan solo aquellas cepas representativas de los perfiles RAPD (excepto p23, p62 y L13).

Para comprobar si realmente las cepas en estudio mostraban habilidad de promover el crecimiento vegetal, estas fueron inoculadas sobre plantas de la especie *M. sativa*, una leguminosa ampliamente estudiada y de gran importancia pascícola. Como parte de un estudio inicial se llevó a cabo un abordaje en condiciones gnotobióticas. La realización de este tipo de ensayos tuvo como objetivo principal la caracterización de las cepas en estudio (esto es, el estudio del efecto de la inoculación exclusiva de las mismas), más que la aproximación a las condiciones reales de campo. Los ensayos fueron llevados a cabo conforme se detalla en el Apartado M.8.2.4., inoculando individualmente cada una de las cepas en estudio sobre 16 semillas previamente esterilizadas y germinadas en condiciones *in vitro*. Se incluyó además el mismo número de semillas tratadas con solución salina estéril a modo de control negativo de la inoculación bacteriana.

Una vez desarrolladas las plantas, se evaluó el efecto del tratamiento bacteriano sobre el crecimiento vegetal en términos de altura del tallo, y peso fresco y seco de la parte aérea.

VI.2.7. Estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre quercíneas

Conocido el efecto sobre *M. sativa* se procedió a la realización de un ensayo sobre quercíneas, concretamente sobre el hospedador a partir del cual las cepas bacterianas fueron aisladas (*Q. pyrenaica*) y sobre encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*). En este caso, el experimento fue llevado a cabo en condiciones no gnotobióticas, dado el interés en conocer el efecto de la inoculación bacteriana sobre dichas especies en condiciones próximas a las típicas de un vivero. Así pues, los experimentos fueron

realizados conforme se describe en el Apartado M.8.2.5. empleando bellotas lavadas y desinfectadas pero no esterilizadas, al objeto de reducir la carga microbiana inicial. En este caso, se inoculó individualmente una cepa de cada una de las colecciones bacterianas en estudio cuyo efecto fue previamente evaluado sobre plantas de *M. sativa*. Para ello, se trató de seleccionar aquellas que *in vitro* mostraron un mayor rango de actividades asociadas a la mejora del crecimiento vegetal, descartando cualquier cepa que mostrara una interacción de tipo negativo con otras cepas en cultivo dual. Concretamente, las cepas seleccionadas fueron *Pseudomonas* sp. p48 y *Luteibacter* sp. L7. A su vez, se incluyó en el análisis un tratamiento consistente en la inoculación del consorcio constituido por las dos cepas seleccionadas. Por otro lado, el control negativo de la inoculación supuso la aplicación de solución salina estéril sobre las bellotas de cada hospedador. Debe remarcarse que el nivel de replicación fue de 12 bellotas por cada uno de los tratamientos contemplados en el análisis (incluido el control negativo), y por cada especie vegetal en estudio.

Una vez realizadas todas las determinaciones, se procedió a la comparación estadística de los índices de actividad calculados habiendo previamente analizado la distribución y varianza de cada variable. Los índices de actividad de todas las cepas fueron comparados entre sí para cada una de las propiedades estudiadas, para lo cual se implementaron análisis ANOVA o Kruskal-Wallis en el caso de variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente. Cuando hubo de compararse dos cepas en base a una actividad con distribución paramétrica, se aplicó el test basado en el estadístico t de Student. La identificación de las parejas de cepas entre las cuales se detectaron niveles de actividad significativamente diferentes fue realizada en base al test *post-hoc* HSD de Tukey en el caso de variables con distribución paramétrica y en el resto de los casos, en base al test de Dunn aplicando la corrección de los p-valores mediante el método de Benjamini-Hochberg. Por el contrario, cuando se quiso comparar la variable cuantificada para una cepa con la correspondiente medida para el control negativo, se aplicó el test estadístico de Dunnett, tal y como se detalla en el Apartado M.9.2.1.3. El nivel de confianza seleccionado para todos los test mencionados fue del 95%.

VI.3. Resultados

VI.3.1. Estudio de las propiedades asociadas a la promoción del crecimiento vegetal

Las 44 y 17 cepas correspondientes a los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter*, aisladas de la rizosfera y endosfera de raíz de roble melojo, respectivamente, fueron en un inicio caracterizadas fenotípicamente en base a una serie de propiedades relacionadas con el crecimiento vegetal²⁰. El cambio de coloración del medio CAS desde azul hacia naranja, indicativo de la producción de compuestos quelantes de Fe³⁺, fue

²⁰ Debe aclararse que las cepas pertenecientes a la colección de *Luteibacter* fueron caracterizadas en la mayor medida de lo posible, no siendo factible lograr una caracterización completa. La incapacidad de las mismas para crecer en los diferentes medios mínimos ensayados, de diferente composición y concentración, imposibilitó la realización de ciertos ensayos o la obtención de datos concluyentes. Si bien no se incluyen datos al respecto en la presente Tesis Doctoral, parece fundamental la inclusión de una fuente de nitrógeno proteica o aminoacídica en los medios de cultivo para el crecimiento de las 17 cepas en estudio.

uno de los caracteres estudiados más común entre las cepas que componen la colección relativa al género *Pseudomonas* (Figura VI.1A). Tal es así que tan solo cuatro cepas no resultaron productoras de sideróforos, registrándose un valor mínimo del índice correspondiente equivalente a 1.12 (Tabla VI.1). Por el contrario, en determinados casos (cepas p42 y p45) el diámetro del halo naranja resultó casi dos veces superior al diámetro de las correspondientes colonias. En consecuencia, algunas cepas resultaron significativamente diferentes en cuanto al índice de actividad (Tabla A.3, Anexos).

Las cepas pertenecientes a la colección de *Luteibacter* no fueron capaces de crecer en medio CAS, por lo que se emplearon los métodos de siembra en media placa y en orificios (Figura VI.1B y C). En cualquiera de los dos casos pudo apreciarse un cambio de coloración del medio CAS en las zonas más próximas a todas las colonias bacterianas, apreciándose una tonalidad naranja pálida, al igual que para la cepa *P. endophyticum* PEPV15^T productora de sideróforos. Debido a las particularidades de los métodos de siembra empleados y a la consecuente configuración de las placas Petri, el cambio de coloración tan solo fue valorado cualitativamente. Debe mencionarse que cuando se siguió el método de siembra en media placa pudo intuirse cierta inhibición del crecimiento especialmente en aquellos casos en los que las colonias bacterianas se encontraban más próximas al medio CAS (Figura VI.1C).

Resultados

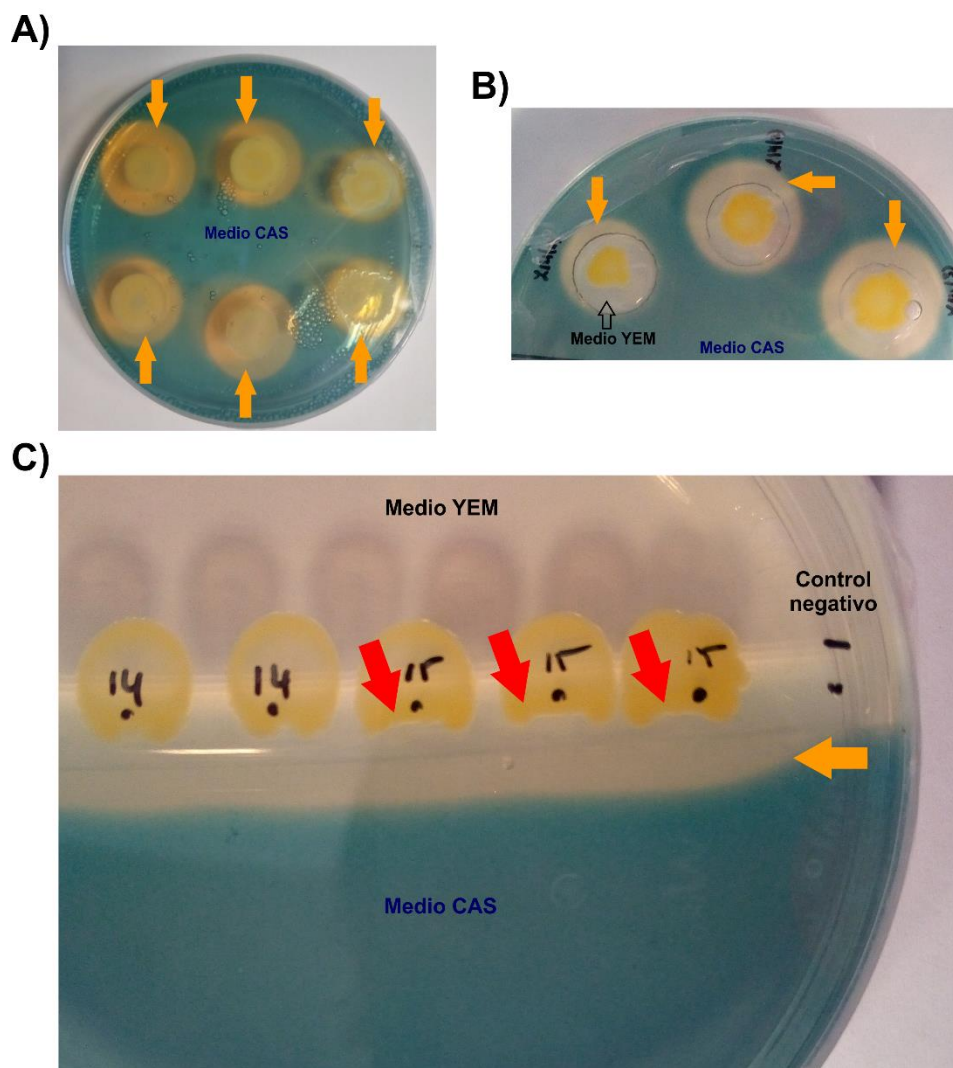


Figura VI.1. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la producción de sideróforos. **A)** Siembra en medio CAS (empleada para el análisis de las cepas correspondientes al género *Pseudomonas*), **B)** Método de siembra en orificios y siembra en media placa (**C**), empleados para el análisis de las cepas correspondientes al género *Luteibacter*. Las flechas naranjas señalan el halo o zona donde se produjo un cambio de coloración del medio CAS de azul a naranja como consecuencia de la producción de sideróforos; las flechas rojas indican la inhibición del crecimiento bacteriano en las zonas próximas al medio CAS, tras 15 días de incubación.

En cuanto a la solubilización de diferentes tipos de sales cálcicas de fosfato cabe destacar que en el caso de producirse un evento de solubilización, para algunas cepas no pudo apreciarse la formación de un halo en torno a las colonias, sino el aclaramiento del medio de cultivo específicamente en la zona sobre la cual se desarrollaban las mismas. Aunque dicha apariencia fue considerada como indicativa de la solubilización de fosfato, ello condujo a la obtención de índices de actividad con valor 1. Así pues, 39 de las 44 cepas rizosféricas fueron capaces de solubilizar CaHPO_4 en el medio NBRIP (Figura VI.2A). Los valores del índice de actividad de las cepas solubilizadoras se encontraron comprendidos en un rango de 1.00 a 2.61, siendo estos registrados para las cepas p24 y p7, respectivamente (Tabla VI.1).

Por otro lado, se pudo observar el aclaramiento del medio de cultivo NBRIP suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en las zonas circundantes o bajo las colonias correspondientes a 31 cepas del género *Pseudomonas* (Figura VI.2B). Así, el valor del

índice de actividad de las mismas se encontró comprendido en el rango 1-1.64 (Tabla VI.1). De las 13 cepas incapaces de solubilizar fosfato tricálcico, nueve sí formaron halos de aclaramiento en el mismo medio suplementado con CaHPO_4 mientras que las cuatro restantes (p23, p34, p51 y p52) no mostraron habilidad de solubilizar ninguno de los fosfatos estudiados. Empero, la cepa p3 formó halos en el medio NBRIP suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pero no en aquel con fosfato dicálcico. Tanto en este caso como en lo que respecta al fosfato dicálcico, en el rango tan amplio de valores del índice de actividad registrados numerosas diferencias estadísticamente significativas entre cepas fueron detectadas (Tabla A.3 incluida en los Anexos).

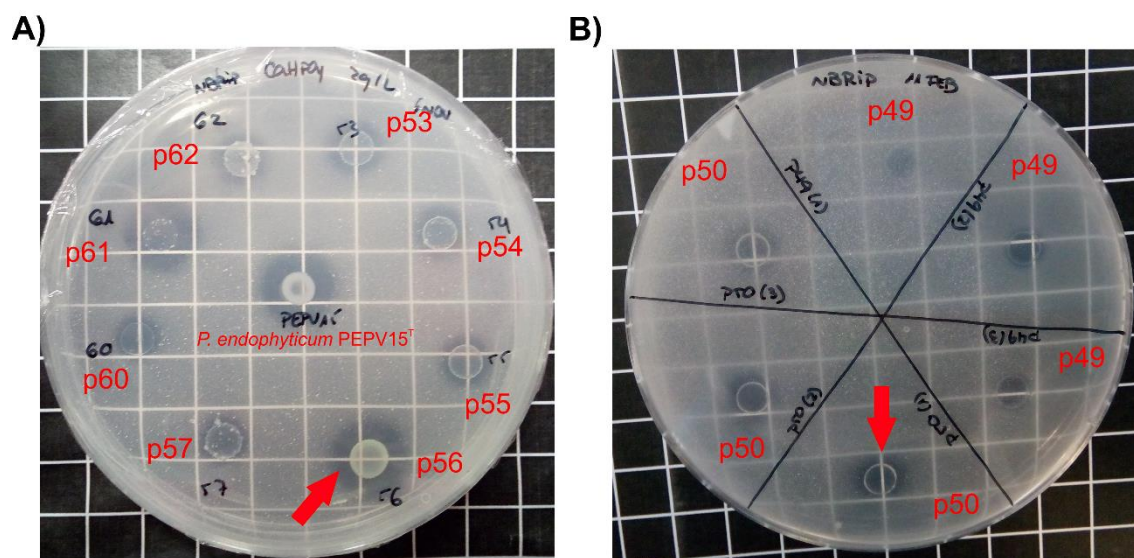


Figura VI.2. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la solubilización de CaHPO_4 (A) y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (B) en medio NBRIP. Con letras rojas se indica el nombre de cada cepa en estudio, y del control positivo incluido en este ensayo (*P. endophyticum* PEPV15^T). Las flechas rojas señalan un ejemplo típico de halos de aclaramiento producidos alrededor de la colonia de cepas solubilizadoras, tras 7 días de incubación. Las placas se encuentran sobre una cuadrícula de cuadrados de 1 cm de lado.

En el caso de *Luteibacter*, las 17 cepas estudiadas fueron capaces de crecer tanto en medio YED-P modificado como en el análogo doblemente modificado, independientemente del tipo de fosfato cálcico estudiado. Sin embargo, no se apreciaron halos transparentes o zonas de aclaramiento en torno a la colonia de ninguna de las cepas en estudio y en ninguno de los medios de cultivo considerados, a diferencia de lo observado para la cepa solubilizadora *P. endophyticum* PEPV15^T.

En cuanto a la producción de compuestos de naturaleza indólica, resultados variables fueron obtenidos en función de la colección de cepas estudiada. Si bien en el caso del género *Pseudomonas* el 50% de las cepas analizadas fue capaz de sintetizar este tipo de compuestos (Tabla VI.1), la totalidad de las cepas que conforman la colección correspondiente al género *Luteibacter* resultaron productoras (Tabla VI.2). Por el contrario, una mayor variabilidad a nivel intragenérico pudo ser detectada en el caso de las cepas aisladas de la rizosfera con respecto a aquellas obtenidas del interior de la raíz de roble melojo. En el primer caso, la concentración de equivalentes de IAA se encontró comprendida entre 40.30 y 97.16 μg de equivalentes de IAA $\cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{DO}_{600}^{-1}$, detectándose diferencias significativas entre un número considerable de cepas (Tabla A.3 de los Anexos). Por el contrario, los valores cuantificados para las cepas adscritas

Resultados

al género *Luteibacter* resultaron considerablemente homogéneos, aunque ciertas diferencias entre cepas fueron registradas (Tabla VI.2).

En lo que respecta a la producción de ACC deaminasa, al contrario de lo observado para la cepa incluida como control positivo (*Achromobacter* sp. VPTA3), tras 7 días de incubación a 30 °C para ninguna de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fue posible detectar un incremento de la DO₆₀₀ en el medio DF suplementado con ACC (con respecto a la DO₆₀₀ medida en el momento de la inoculación). Sin embargo, cuando estas fueron inoculadas en el medio DF conteniendo (NH₄)₂SO₄ como fuente única de N, niveles de DO₆₀₀ superiores a 1 fueron registrados tras aproximadamente 24 h de incubación, sugiriendo que la incapacidad de crecimiento apreciada en el primer caso es achacable a la imposibilidad de crecer con ACC como fuente única de N. Debe mencionarse que la determinación indirecta de la síntesis de ACC deaminasa no pudo llevarse a cabo en el caso de las 17 cepas aisladas del interior de la raíz de roble, dada la mencionada incapacidad de crecer en diferentes medios mínimos.

Capítulo VI

Tabla VI.1. Resultados de la caracterización *in vitro* de las actividades asociadas a la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal, y de la tolerancia a ácido tánico de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*. Los guiones denotan que la actividad en estudio no fue detectada para la cepa concreta. Los datos referentes a la determinación indirecta de la actividad ACC deaminasa, síntesis de catalasa y crecimiento en presencia de ácido tánico como única fuente de N son omitidos en la tabla por claridad y pueden consultarse en el texto (Apartado VI.3.1.). Las parejas de cepas entre las que se observaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a los índices de actividad se recogen en la Tabla A.3 (Anexos).

Cepa	Mecanismos directos			Mecanismos indirectos			Taninos
	Producción sideróforos ^a	Solubilización fosfato inorgánico ^a		IAA ^b	Degradación CMC ^a	Degradación proteínas ^a	Tolerancia ^c
		CaHPO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂				
p1	1.23 ± 0.09	1.38 ± 0.05	1.00 ± 0.00	59.04 ± 4.58	2.38 ± 0.11	-	0.04
p2	1.65 ± 0.16	1.58 ± 0.08	-	-	2.21 ± 0.11	-	2
p3	1.35 ± 0.05	-	1.17 ± 0.00	55.84 ± 9.46	2.42 ± 0.19	1.18 ± 0.04	0.04
p4	1.35 ± 0.02	2.31 ± 0.11	1.40 ± 0.09	44.89 ± 8.62	2.34 ± 0.14	-	0.04
p7	1.58 ± 0.08	2.61 ± 0.10	1.23 ± 0.21	-	-	1.45 ± 0.03	5
p9	1.25 ± 0.04	1.46 ± 0.08	-	81.46 ± 1.40	2.46 ± 0.10	-	0.2
p10	1.62 ± 0.05	1.42 ± 0.07	-	56.24 ± 1.21	1.90 ± 0.10	-	0.04
p11	1.17 ± 0.03	1.43 ± 0.13	1.00 ± 0.00	86.58 ± 8.98	2.29 ± 0.36	-	0.04
p12	1.21 ± 0.04	1.75 ± 0.08	1.34 ± 0.02	52.45 ± 1.02	2.47 ± 0.15	-	0.04
p13	1.49 ± 0.03	1.43 ± 0.00	1.25 ± 0.00	-	-	-	2
p14	1.42 ± 0.04	1.34 ± 0.09	1.00 ± 0.00	49.83 ± 3.94	1.83 ± 0.16	-	0.04
p15	1.25 ± 0.03	1.37 ± 0.05	-	51.31 ± 1.39	2.11 ± 0.11	-	0.2
p16	1.15 ± 0.06	2.17 ± 0.09	-	61.92 ± 1.50	1.88 ± 0.49	-	0.04
p17	1.27 ± 0.12	1.36 ± 0.07	-	-	1.58 ± 0.03	1.36 ± 0.04	2
p18	-	1.42 ± 0.08	1.00 ± 0.00	42.33 ± 1.82	2.10 ± 0.20	-	0.2
p19	1.58 ± 0.03	2.22 ± 0.05	1.55 ± 0.05	-	-	1.57 ± 0.34	5
p20	1.36 ± 0.19	1.31 ± 0.27	1.00 ± 0.00	64.38 ± 2.45	1.73 ± 0.20	-	0.008
p23	-	-	-	-	-	2.05 ± 0.06	2
p24	1.18 ± 0.06	1.00 ± 0.00	-	97.16 ± 8.83	2.02 ± 0.15	-	0.2
p25	1.27 ± 0.08	2.02 ± 0.11	1.32 ± 0.08	-	1.67 ± 0.16	1.72 ± 0.05	5
p30	1.12 ± 0.05	2.05 ± 0.08	1.25 ± 0.12	-	1.27 ± 0.12	1.74 ± 0.03	1
p31	1.49 ± 0.01	2.08 ± 0.08	1.31 ± 0.05	2.4 ± 0.21	1.68 ± 0.07	1.37 ± 0.06	2
p33	1.29 ± 0.09	2.34 ± 0.10	-	-	1.61 ± 0.06	-	5
p34	1.32 ± 0.08	-	-	62.38 ± 7.29	1.62 ± 0.26	-	0.2

Resultados

Cepa	Mecanismos directos				Mecanismos indirectos		Taninos
	Producción sideróforos ^a	Solubilización fosfato inorgánico ^a		IAA ^b	Degradación CMC ^a	Degradación proteínas ^a	Tolerancia ^c
		CaHPO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂				
p37	1.43 ± 0.05	1.98 ± 0.04	1.06 ± 0.10	-	1.55 ± 0.05	1.77 ± 0.04	5
p42	1.92 ± 0.12	2.06 ± 0.10	1.28 ± 0.05	-	1.42 ± 0.03	1.70 ± 0.06	2
p43	1.60 ± 0.16	2.03 ± 0.14	1.34 ± 0.14	-	1.17 ± 0.07	1.66 ± 0.11	2
p44	1.28 ± 0.03	2.07 ± 0.07	1.23 ± 0.11	-	1.23 ± 0.06	1.29 ± 0.01	2
p45	1.90 ± 0.00	2.48 ± 0.08	1.36 ± 0.13	-	-	1.26 ± 0.02	5
p47	1.14 ± 0.06	1.22 ± 0.19	1.00 ± 0.00	83.30 ± 9.69	2.00 ± 0.11	-	0.04
p48	1.36 ± 0.07	2.08 ± 0.07	1.38 ± 0.04	-	1.74 ± 0.05	1.38 ± 0.02	5
p49	1.41 ± 0.04	1.11 ± 0.19	1.11 ± 0.10	62.57 ± 8.14	1.42 ± 0.13	-	5
p50	1.16 ± 0.07	1.98 ± 0.11	1.64 ± 0.05	56.9 ± 2.52	2.50 ± 0.13	-	0.04
p51	1.56 ± 0.16	-	-	51.11 ± 7.55	2.10 ± 0.10	-	0.2
p52	-	-	-	42.12 ± 4.24	1.88 ± 0.13	-	0.2
p53	1.41 ± 0.01	1.56 ± 0.10	1.22 ± 0.05	-	2.04 ± 0.06	1.24 ± 0.02	2
p54	1.24 ± 0.03	1.56 ± 0.10	1.00 ± 0.00	-	1.58 ± 0.12	-	1.75
p55	1.21 ± 0.05	1.36 ± 0.05	1.00 ± 0.00	-	1.53 ± 0.06	1.23 ± 0.02	2
p56	1.44 ± 0.05	1.93 ± 0.09	1.28 ± 0.05	-	2.01 ± 0.39	1.77 ± 0.04	5
p57	1.45 ± 0.03	1.33 ± 0.05	1.00 ± 0.00	42.94 ± 1.43	2.17 ± 0.21	-	1
p60	1.66 ± 0.04	1.23 ± 0.09	-	40.30 ± 2.07	-	-	0.2
p61	1.42 ± 0.12	2.00 ± 0.16	1.40 ± 0.12	-	1.22 ± 0.10	1.51 ± 0.38	2
p62	-	1.58 ± 0.08	1.06 ± 0.05	81.15 ± 0.55	1.87 ± 0.77	-	0.2

^a Se indica, para cada cepa, el valor promedio del índice de actividad correspondiente de las tres réplicas analizadas ± desviación estándar.

^b Se indica, para cada cepa, la concentración promedio de equivalentes de IAA por densidad celular de las tres réplicas analizadas ± desviación estándar (µg de equivalentes de IAA · mL⁻¹ · DO₆₀₀⁻¹).

^c Se indica, para cada cepa, la concentración máxima ensayada de ácido tánico tolerada (mg/mL).

Tabla VI.2. Resultados de la caracterización *in vitro* de las actividades asociadas a la promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal, y de la tolerancia a ácido tánico de las cepas pertenecientes al género *Luteibacter* aisladas de la endosfera radicular de *Q. pyrenaica*. Los guiones denotan que la actividad en estudio no fue detectada para la cepa concreta. Los datos referentes a la producción de sideróforos, solubilización de fosfato di- y tricálcico, detección indirecta de ACC deaminasa, síntesis de catalasa y crecimiento en presencia de ácido tánico como única fuente de N son omitidos en esta tabla por claridad y pueden consultarse en el texto (Apartado VI.3.1.). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre cepas en cuanto a la concentración de IAA (test *post-hoc* HSD de Tukey). En el caso del índice de actividad calculado para la degradación de CMC y proteínas se omiten las correspondientes letras dada la ausencia de diferencias significativas entre cepas (test *post-hoc* de Dunn con corrección de los p-valores de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples, test t de Student, respectivamente). El nivel de confianza de todos los test estadísticos fue del 95%.

Cepa	Mecanismo directo	Mecanismos indirectos		Taninos
	IAA ^a	Degradación CMC ^a	Degradación proteínas ^c	Tolerancia ^c
L1	44.05 ± 7.90 a	0.40 ± 0.02	-	0.04
L3	40.54 ± 5.71 ab	0.41 ± 0.01	-	0.04
L5	41.01 ± 1.35 ab	0.42 ± 0.01	-	0.04
L6	44.36 ± 4.10 a	0.38 ± 0.03	-	0.04
L7	41.07 ± 5.12 ab	0.40 ± 0.02	1.74 ± 0.14	0.04
L8	29.72 ± 2.07 b	0.40 ± 0.02	-	0.04
L9	39.94 ± 2.89 ab	0.40 ± 0.02	-	0.04
L10	39.18 ± 4.76 ab	0.36 ± 0.01	2.00 ± 0.14	0.04
L12	38.96 ± 3.34 ab	0.35 ± 0.02	-	0.04
L13	36.46 ± 0.54 ab	0.33 ± 0.03	-	0.04
L14	38.67 ± 2.91 ab	0.33 ± 0.02	-	0.04
L15	35.79 ± 0.27 ab	0.41 ± 0.02	-	0.04
L18	34.12 ± 1.83 ab	0.41 ± 0.03	-	0.04
L20	37.88 ± 3.30 ab	0.38 ± 0.00	-	0.04
L21	36.43 ± 1.59 ab	0.38 ± 0.01	-	0.04
L22	41.57 ± 3.46 ab	0.39 ± 0.01	-	0.04
L50	35.91 ± 1.86 ab	0.37 ± 0.00	-	0.04

^a Se indica, para cada cepa, la concentración promedio de equivalentes de IAA por densidad celular de las tres réplicas analizadas ± desviación estándar (µg de equivalentes de IAA · mL⁻¹ · DO₆₀₀⁻¹).

^b Se indica, para cada cepa, el valor promedio del índice de actividad correspondiente de las tres réplicas analizadas ± desviación estándar.

^c Se indica, para cada cepa, la concentración máxima ensayada de ácido tánico tolerada (mg/mL).

VI.3.2. Estudio de las propiedades asociadas al antagonismo de hongos y oomicetos fitopatógenos

Las 61 cepas en estudio fueron también caracterizadas en base a su potencial como agentes de biocontrol, estudiando para ello ciertas propiedades relacionadas con el antagonismo de hongos y oomicetos, como la capacidad de detoxificar peróxido de hidrógeno (H₂O₂), degradar el derivado celulósico CMC e hidrolizar proteínas.

Cuando se puso en contacto H₂O₂ con la biomasa bacteriana correspondiente a las 61 cepas en estudio se pudo apreciar la aparición de burbujas en todos los casos, denotando la capacidad de descomponer dicho compuesto oxidante gracias a la actividad del enzima catalasa.

Resultados

Por el contrario, la actividad proteolítica fue detectada para aproximadamente un 41% de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, observándose en tales casos halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas (Figura VI.3). El valor mínimo y máximo del índice de actividad fue 1.18 y 2.05, siendo estos registrados para las cepas p3 y p23, respectivamente (Tabla VI.1). Cabe destacar que pudieron apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre ciertas cepas en cuanto al índice de actividad proteolítica se refiere (Tabla A.3 incluida en los Anexos).

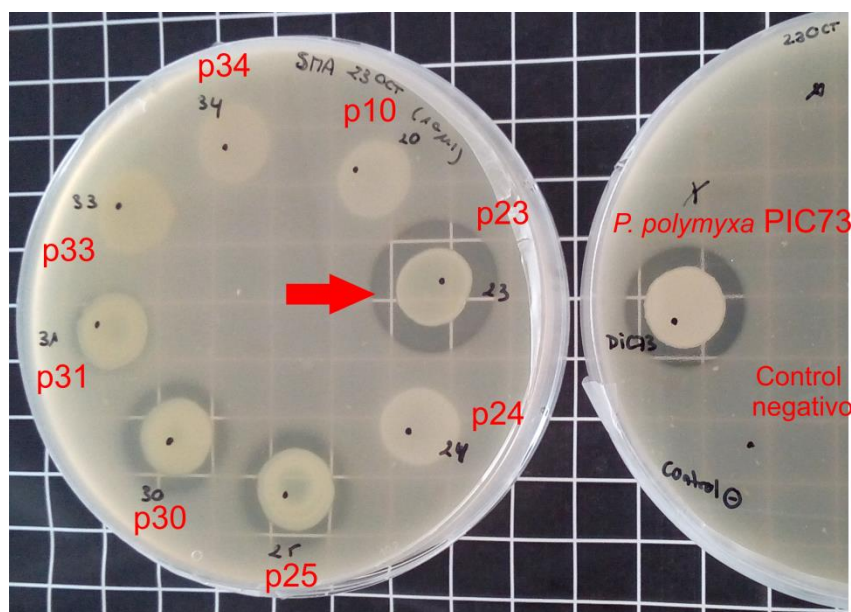


Figura VI.3. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la producción de proteasas en el medio SMA. Con letras rojas se indica el nombre cada cepa en estudio. La flecha roja señala uno de los halos de aclaramiento típicamente observado en torno a la colonia de una cepa con actividad proteolítica, tras 5 días de incubación. Las placas se encuentran sobre una cuadrícula de cuadrados de 1 cm de lado.

En el caso de la colección de cepas pertenecientes al género *Luteibacter* debe mencionarse que transcurridos siete días de incubación tan solo las cepas L7 y L10 resultaron productoras de proteasas, a tenor del circundante halo de aclaramiento. Así pues, el índice de actividad registrado para ambas cepas fue de 1.74 y 2.0, respectivamente.

Tras añadir solución de lugol a las placas con medio CMC, se pudo apreciar que el 86.4% de las cepas adscritas al género *Pseudomonas* mostraba un halo amarillo alrededor de sus colonias, indicativo de la actividad endocelulolítica. El índice de actividad correspondiente se encontró comprendido en un rango relativamente amplio (1.17-2.5, Tabla VI.1), siendo numerosas las cepas significativamente diferentes entre sí en lo que respecta al mismo (Tabla A.3 incluida en los Anexos). Por otro lado, las 17 cepas pertenecientes al género *Luteibacter* fueron capaces de degradar el derivado celulósico, observándose halos amarillos alrededor de las colonias tras la ausencia de tinción con lugol de los productos de hidrólisis (Figura VI.4). Cabe destacar que la actividad de todas las cepas resultó homogénea al no detectarse diferencias significativas entre las mismas.

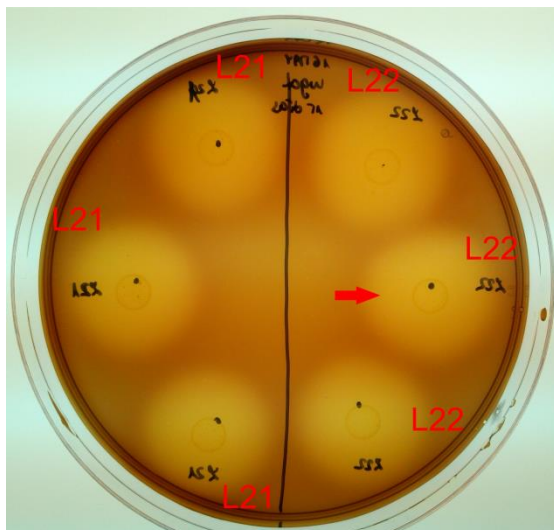


Figura VI.4. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la producción de endocelulasas con actividad sobre el derivado celulósico CMC. Con letras rojas se indica el nombre cada cepa en estudio. La flecha roja señala uno de los halos amarillos típicamente observados alrededor de las colonias de cepas con actividad degradadora, tras el revelado con lugol a los 15 días de incubación. El color marrón de la placa corresponde al derivado celulósico íntegro teñido con lugol, mientras que los productos de hidrólisis localizados en el entorno de las colonias de cepas degradadoras se mantienen sin teñir con la solución de yodo.

VI.3.3. Estudio de la tolerancia y utilización de ácido tánico como fuente de C

En primer lugar debe mencionarse que el DMSO en el que se encontraba disuelto el compuesto con propiedades antimicrobianas estudiado (ácido tánico) no resultó tóxico para ninguna de las cepas a la concentración ensayada, apreciándose un desarrollo normal de las colonias en presencia de dicho compuesto.

Todas las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron capaces de tolerar una concentración del tanino de hasta 40 µg/mL, a excepción de p20 la cual solo resultó tolerante a la mínima concentración ensayada. A partir de 40 µg/mL se pudo observar un descenso del número de cepas tolerantes conforme aumentaba la concentración de ácido tánico en el medio: el 77.3% de las cepas estudiadas pudieron crecer en presencia de 200 µg/mL del tanino, reduciéndose esta proporción hasta el 56.8% cuando la concentración del mismo se incrementó cinco veces. La cantidad de cepas capaces de tolerar el ácido tánico se mantuvo constante (47.7%) cuando la concentración de este se encontraba entre 1.125-1.75 mg/mL, y tan solo dos cepas más se mostraron sensibles a 2 mg/mL del tanino en el medio. Cabe destacar que únicamente nueve cepas crecieron a la mayor concentración de ácido tánico estudiada, esto es, 5 mg/mL. La relación de cepas capaces de tolerar las diferentes concentraciones del tanino evaluadas se encuentra recogida en la Tabla VI.1.

Por otro lado, debe remarcarse que en torno a algunas de las colonias formadas en el medio suplementado con 2 ó 5 mg/mL del tanino tuvo lugar un oscurecimiento del medio de cultivo e incluso la formación de un halo de coloración parda, el cual se ilustra en la Figura VI.5. Por otro lado, la concentración máxima tolerada por todas las cepas del género *Luteibacter* fue 40 µg/mL.

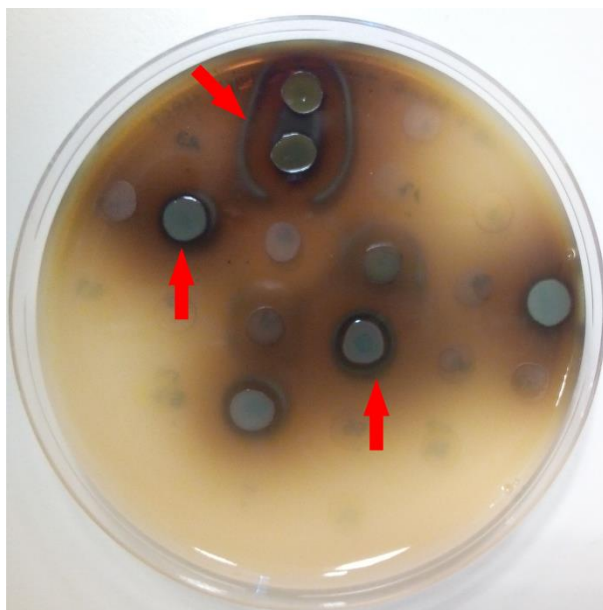


Figura VI.5. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de evaluación de la tolerancia de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* a ácido tánico en medio LB suplementado con el tanino. Las flechas rojas señalan algunas de las zonas de color pardo circundantes a las colonias de cepas tolerantes a una concentración de 5 mg/mL de ácido tánico, tras 4 días de incubación. Por claridad de la imagen, se omite el nombre de las correspondientes cepas.

Cuando las cepas de la colección de *Pseudomonas* fueron crecidas en cultivo líquido con ácido tánico como exclusiva fuente de C, tras 7 días de incubación no fue posible detectar un aumento de la DO_{600} con respecto a la DO_{600} inicial (aquella registrada inmediatamente tras la inoculación del medio). Por el contrario, todas las cepas fueron capaces de crecer en el mismo medio suplementado con D-Glucosa como única fuente de carbono, alcanzándose valores de DO_{600} superiores a 1 incluso tras 24 h de cultivo. Esto es, tras 7 días de incubación las bacterias no fueron capaces de crecer en presencia de ácido tánico en las condiciones ensayadas. En el caso de las cepas pertenecientes al género *Luteibacter*, no fue posible ni tan siquiera detectar un incremento de la DO_{600} en medio DF suplementado con D-Glucosa.

VI.3.4. Ensayos *in vitro* de antagonismo bacteria-bacteria

Con la intención de caracterizar las cepas en estudio a un mayor nivel de profundidad y determinar si se podrían combinar entre sí para la formulación de un consorcio bacteriano, se llevaron a cabo cultivos duales de las 15 cepas seleccionadas. Tan solo p19 y p43 protagonizaron eventos de inhibición del crecimiento de ciertas cepas *target*, si bien cabe destacar que los resultados variaron en función del medio de cultivo empleado. Tal es así, que ninguna de las dos cepas fue capaz de inhibir el crecimiento de una misma cepa *target* en los dos medios de cultivo empleados (Tabla VI.3). Por otro lado debe remarcarse que ni L5 ni L7 – las dos únicas cepas analizadas del género *Luteibacter* – antagonizaron el crecimiento de ninguna otra cepa, ni de los congéneres estudiados ni de las cepas correspondientes al género *Pseudomonas*.

Tabla VI.3. Resultados del ensayo *in vitro* de antagonismo bacteria-bacteria entre las 15 cepas seleccionadas asociadas a la raíz de *Q. pyrenaica*. El signo “+” denota el crecimiento de las cepas *target* y *challenger* cuando ambas fueron co-cultivadas. El signo “-” indica que se produjo inhibición del crecimiento de la cepa *target* cuando fue enfrentada a la cepa *challenger* correspondiente. La letra “D” indica que la inhibición fue débil. En color negro se representan los resultados obtenidos en medio LB, mientras que los azules corresponden al medio YEM, tras 48 h de co-cultivo.

		<i>Challenger</i>														
		p2	p3	p14	p19	p24	p34	p43	p48	p51	p52	p54	p60	p61	L5	L7
<i>Target</i>	p2		++	++	D+	++		++	++	++	++	++	++	++	++	++
	p3	++		++	-+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	p14	++	++		D+	++	++	+D	++	++	++	++	++	++	++	++
	p19	++	++	++		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	p24	++	++	++	-+		++	+ -	++	++	++	++	++	++	++	++
	p34	++	++	++	++	++		+ -	++	++	++	++	++	++	++	++
	p43	++		++	++	++	++		++	++	++	++	++	++	++	++
	p48	++	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++	++	++
	p51	++	++	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++	++
	p52	++	++	++	-+	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
	p54	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++
	p60	++	++	++	-+	++	++	+D	++	++	++	++		++	++	++
	p61	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++		++	++
	L5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++		++
	L7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	

Por otro lado debe destacarse que si bien en este ensayo no se cuantificó el nivel de antagonismo, los halos de inhibición del crecimiento de algunas cepas *target* pudieron verse con gran claridad (Figura VI.6A y B), observándose en otros casos halos de inhibición no tan nítidos, siendo por tanto considerados como indicios de interacción antagónica.

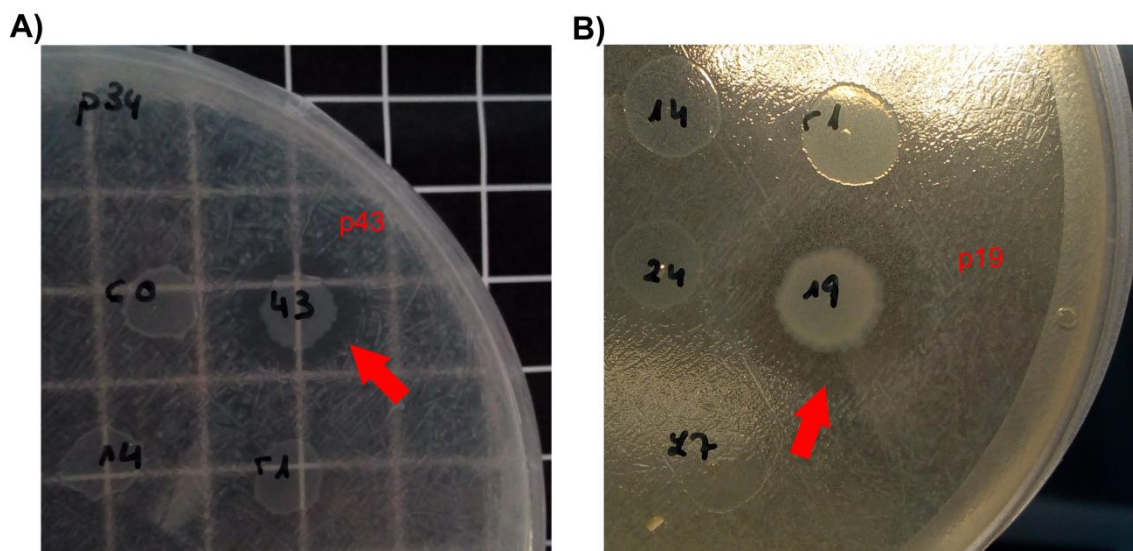


Figura VI.6. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo de antagonismo bacteria-bacteria en medio YEM (A) y en medio LB (B), siendo las cepas *target* p34 y p60, respectivamente. Con letras rojas se indica el nombre de las cepas *challenger* que en ambos casos mostraron una interacción negativa con la cepa *target*, tras 48 h de co-cultivo. Las flechas rojas señalan el halo de inhibición típicamente observado alrededor de cepas *challenger* con efecto antagónico. Las placas Petri correspondiente al panel A) se encuentra sobre una cuadrícula de cuadrados de 1 cm de lado.

VI.3.5. Ensayos in vitro de antagonismo bacteria-oomiceto/hongos fitopatógenos

Las 61 cepas en estudio fueron enfrentadas a las cepas fúngicas *B. mediterranea* 5, *B. mediterranea* 226, *D. corticola* 58, *D. corticola* 155, *A. mellea* 860 y al oomiceto *P. cinnamomi* UEx1, mediante co-cultivo de los mismos. De todas las cepas analizadas, p2 y p53 fueron las únicas para las cuales pudieron apreciarse eventos de antagonismo del crecimiento de todos los hongos estudiados, observándose marcados halos de inhibición del crecimiento micelial (Figura VI.7A y B). Tales halos fueron igualmente observados en el caso de la cepa *P. polymyxa* PIC73 empleada como control positivo de la inhibición fúngica.

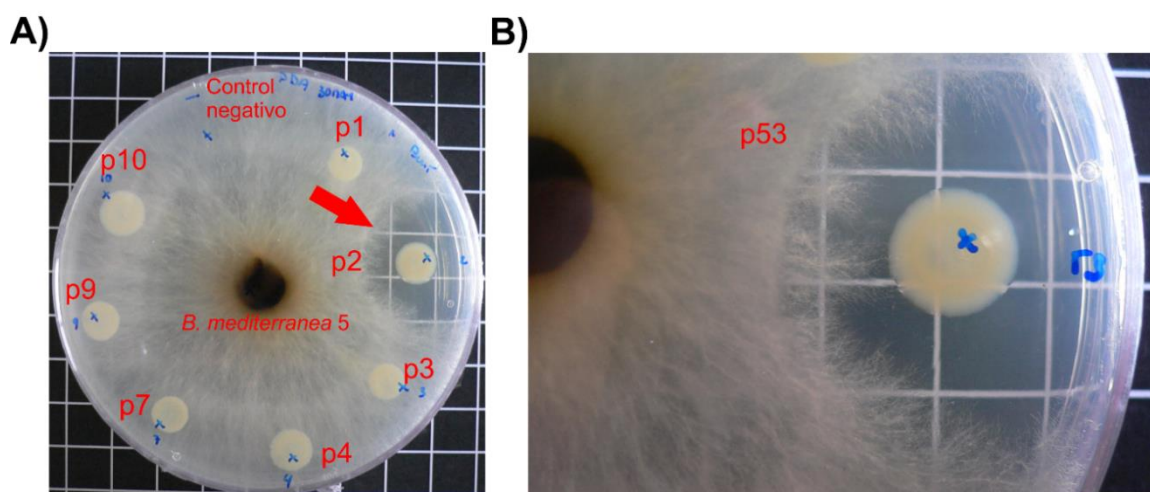


Figura VI.7. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo preliminar de antagonismo bacteria-*Biscogniauxia mediterranea* 5 (A) y detalle del halo de inhibición en torno a la colonia correspondiente a la cepa p53 (B). Con letras rojas se indica el nombre de las cepas estudiadas. La flecha roja señala el halo de inhibición típicamente observado alrededor de cepas con efecto antagónico, en medio PDA y tras 48 h de incubación. Las placas Petri se encuentran sobre una cuadrícula de cuadrados de 1 cm de lado.

Por otro lado, debe mencionarse que cuando las cepas p2 y p53 fueron co-cultivadas durante 10 días con *A. mellea* 860 no tuvo lugar la formación de un halo de inhibición perfectamente distinguible como los que se muestran en la Figura VI.8. Sin embargo, pudo apreciarse un cese del desarrollo del micelio con respecto al inicialmente registrado en el momento en el que las bacterias fueron sembradas en el medio. Dicho fenómeno no fue observado ni en el caso del control negativo ni para el resto de cepas (Figura VI.8A). Cabe destacar que cuando el hongo fue co-cultivado individualmente con las cepas p2 y p53, tampoco se apreció desarrollo de rizomorfos nuevos ni crecimiento de los ya formados en las proximidades de las colonias bacterianas. Por el contrario, sí se pudo apreciar el desarrollo de dichas estructuras en las zonas distales a la interacción hongo-bacteria (Figura VI.8B).

Por el contrario, ninguna de las cepas adscritas al género *Pseudomonas* ni al género *Luteibacter* inhibió el crecimiento del oomiceto *P. cinnamomi* UEx1.

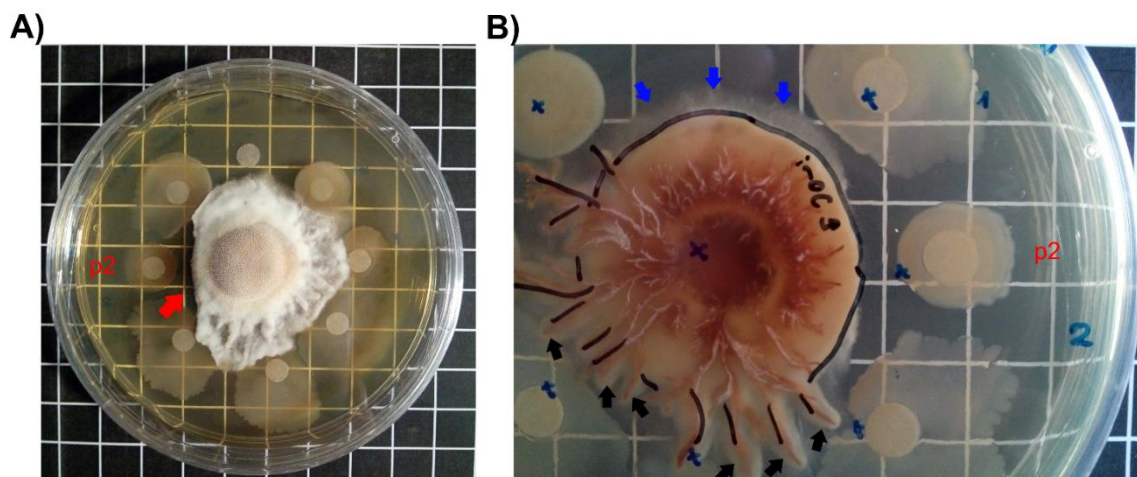


Figura VI.8. Aspecto de las placas Petri correspondientes al ensayo preliminar de antagonismo bacteria-*Armillaria mellea* 860 (A) y detalle de la inhibición del desarrollo micelial y de rizomorfos por parte de la cepa p2, ambos en medio MEA. Con letras rojas se indica el nombre de la cepa con actividad antagónica. La flecha roja señala la inhibición del crecimiento del micelio del hongo. Las líneas negras en el reverso de la placa Petri (B) fueron marcadas en el momento de la siembra bacteriana para indicar el alcance del micelio y rizomorfos de *A. mellea* 860 en ese preciso momento, y evaluar posteriormente el crecimiento de dichas estructuras fúngicas. Las flechas azules y negras señalan el crecimiento del micelio y los rizomorfos, respectivamente, tras 7 días de la inoculación bacteriana. Las placas Petri se encuentran sobre una cuadrícula de cuadrados de 1 cm de lado. Por claridad de la imagen, tan solo se indica el nombre de la cepa antagónica.

VI.3.6. Estudio del efecto de la inoculación bacteriana sobre hospedadores vegetales

VI.3.6.1. Efecto sobre *Medicago sativa* L. 'Victoria' (alfalfa)

Como parte de un estudio preliminar y al objeto de caracterizar fenotípicamente en mayor detalle las cepas en estudio, se seleccionaron aquellas representativas de los perfiles RAPD, a excepción de las cepas *Pseudomonas* p23 y p62, y *Luteibacter* sp. L13 y se estudió la capacidad de las mismas de promover el crecimiento de plantas de alfalfa.

De todos los tratamientos estudiados, destacan las plantas inoculadas con las cepas p24, p34, p48, p52 y p61 del género *Pseudomonas*, y L5 y L7 (género *Luteibacter*), por ser estadísticamente diferentes respecto a las plantas no inoculadas en términos de la altura del tallo y peso fresco y seco de la parte aérea (test de Dunnet, p-valores < 0.014). Las plantas tratadas con las mencionadas cepas resultaron ser superiores en cuanto a los mencionados parámetros biométricos, aunque la magnitud de las diferencias dependió del tratamiento considerado (Tabla VI.4). En algunos casos se pudo apreciar un incremento considerable de los parámetros vegetales medidos. Por ejemplo, para aquellas plantas tratadas con la cepa p52 llegaron a registrarse valores aproximadamente dos veces superiores del peso fresco y peso seco de la parte aérea y de la altura del tallo en comparación con las plantas no inoculadas.

Tabla VI.4. Parámetros biométricos de las plantas de *M. sativa* inoculadas con cada una de las cepas seleccionadas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter*, y de las plantas no inoculadas. Se indica el valor promedio de todas las réplicas \pm desviación estándar de cada parámetro medido y para cada tratamiento. En cada columna, los asteriscos denotan diferencias significativas en la variable considerada, entre las plantas sometidas al tratamiento correspondiente y el control no inoculado (test ANOVA o Kruskal-Wallis, seguido del test *post-hoc* de Dunnet, todos ellos realizados a un nivel de confianza del 95%).

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Altura (cm)
Control	0.46 \pm 0.15	0.10 \pm 0.03	16.51 \pm 4.31
p2	0.44 \pm 0.29	0.09 \pm 0.06	14.70 \pm 7.32
p3	0.77 \pm 0.20	0.15 \pm 0.04	24.18 \pm 3.28*
p14	0.64 \pm 0.31	0.13 \pm 0.06	18.94 \pm 5.59
p19	0.83 \pm 0.36	0.16 \pm 0.05*	23.08 \pm 6.96*
p24	1.00 \pm 0.37*	0.18 \pm 0.06*	25.08 \pm 6.06*
p34	1.13 \pm 0.47*	0.17 \pm 0.06*	26.21 \pm 5.30*
p43	0.83 \pm 0.35	0.15 \pm 0.05	22.78 \pm 5.49*
p48	1.01 \pm 0.26*	0.18 \pm 0.03*	27.67 \pm 4.06*
p51	0.83 \pm 0.32	0.14 \pm 0.04	24.13 \pm 3.96*
p52	1.17 \pm 0.30*	0.20 \pm 0.04*	30.76 \pm 4.28*
p54	0.70 \pm 0.29	0.14 \pm 0.05	22.32 \pm 5.63
p60	0.84 \pm 0.24	0.16 \pm 0.05	23.74 \pm 5.33*
p61	1.06 \pm 0.47*	0.17 \pm 0.04*	26.20 \pm 5.24*
L5	1.01 \pm 0.19*	0.19 \pm 0.03*	24.63 \pm 3.18*
L7	0.99 \pm 0.19*	0.18 \pm 0.02*	25.85 \pm 2.90*

La longitud del tallo de las plantas inoculadas con las cepas p3, p19, p43, p51 y p60 también fue significativamente más elevada que la correspondiente a las plantas no inoculadas (test de Dunnet, p-valores < 0.050). De todas las cepas recién mencionadas, p19 fue la única que además resultó en un mayor valor de otro de los parámetros medidos, concretamente el peso seco de la parte aérea (Tabla VI.4).

Cabe señalar que las plantas tratadas con las cepas p2, p14 o p54 fueron las únicas que no mostraron diferencias estadísticamente significativas con aquellas no inoculadas en lo que respecta a ninguno de los parámetros biométricos evaluados.

VI.3.6.2. Efecto sobre quercíneas: roble melojo (*Q. pyrenaica*) y encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*)

Conocida la actividad asociada a la mejora del crecimiento vegetal *in vitro* y el efecto positivo sobre alfalfa de las cepas p48 y L7, estas fueron inoculadas de forma individualizada y combinadas sobre bellotas de roble melojo y encina, como parte de un estudio preliminar.

Cabe destacar que ni en el caso de la inoculación individualizada de las dos cepas, ni en el caso de la aplicación del consorcio bacteriano fueron apreciadas diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros evaluados con respecto a

Resultados

las plantas no tratadas (Tabla VI.5). Dicho patrón homogéneo fue observado tanto en el caso de roble melojo como en el de encina (test de Dunnet, p-valores > 0.077).

Tabla VI.5. Parámetros biométricos de las plantas de *Q. pyrenaica* y *Q. ilex* subsp. *ballota* inoculadas con las cepas seleccionadas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter*, y de las plantas no inoculadas. Se indica el valor promedio de todas las réplicas \pm desviación estándar de cada parámetro medido y para cada tratamiento.

Hospedador	Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Altura (cm)
<i>Q. pyrenaica</i>	Control	1.69 \pm 0.39	0.80 \pm 0.22	5.89 \pm 1.60
	p48	1.69 \pm 0.42	0.74 \pm 0.23	6.59 \pm 1.58
	L7	1.26 \pm 0.61	0.55 \pm 0.30	5.94 \pm 2.73
	p48 + L7	1.47 \pm 0.56	0.68 \pm 0.25	6.32 \pm 1.52
<i>Q. ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	Control	2.40 \pm 0.72	1.28 \pm 0.35	7.59 \pm 2.05
	p48	2.33 \pm 0.69	1.18 \pm 0.42	7.44 \pm 2.32
	L7	2.06 \pm 0.97	1.07 \pm 0.55	5.95 \pm 2.35
	p48 + L7	2.20 \pm 0.62	1.16 \pm 0.32	7.11 \pm 1.51

VI.4. Discusión

Las 61 cepas asociadas a la raíz de roble melojo fueron evaluadas en base a su capacidad *in vitro* para promover – mediante mecanismos directos o indirectos – el crecimiento vegetal, ahondando en el efecto sobre varios hospedadores. Así pues, con el diseño experimental seguido se pretendió sentar las bases para el desarrollo futuro de posibles bioformulaciones, describiendo en la mayor medida de lo posible el potencial de las cepas en estudio.

La síntesis bacteriana de sideróforos habitualmente se encuentra asociada a una estimulación del crecimiento vegetal, debido a la mayor facilidad de las plantas para adquirir el hierro presente en el suelo, y a la competición por dicho nutriente con otros microorganismos. En el presente caso, la gran mayoría de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron capaces de producir sideróforos en mayor o menor medida. Destacaron fundamentalmente las cepas p42 y p45 por su índice de actividad próximo a 2. En tanto, las cepas p18, p23, p52 y p62 no fueron capaces de producir moléculas quelantes de Fe³⁺. El elevado número de cepas productoras de sideróforos no resultó sorprendente ya que el género *Pseudomonas* es conocido por la gran variedad de sideróforos que las especies adscritas al mismo son capaces de producir.

En lo que respecta a las cepas pertenecientes al género *Luteibacter*, ninguna fue capaz de crecer en el medio CAS. A su vez, cuando se empleó el método de siembra en media placa pudo apreciarse una reducción del crecimiento bacteriano en la zona próxima a dicho medio. Todo ello sugiere un efecto inhibitorio del medio CAS sobre las bacterias, debido probablemente al efecto tóxico que el detergente catiónico HDTMA incluido en la composición de dicho medio tiene sobre algunos microorganismos (Schwyn y Neilands, 1987). En tanto, cuando todas las cepas crecieron en su medio de cultivo rutinario y próximas pero físicamente separadas del medio CAS, pudo apreciarse un cambio de coloración del mismo. Mediante el empleo de ambos métodos de siembra se observó el mismo fenómeno, lo cual sugiere la producción y excreción de moléculas quelantes de Fe³⁺ difusibles en el medio de cultivo por parte de las cepas mencionadas.

Cabe destacar que si bien el género *Luteibacter* permanece poco estudiado en la actualidad, Guglielmetti y colaboradores (2013) ya informaron sobre este mismo fenotipo para la especie *L. rhizovicius*, a la cual posiblemente pertenecen las 17 cepas aisladas de la endosfera radicular de roble melojo. Tanto en el trabajo de los mencionados autores como en la presente Tesis se emplearon varios métodos basados en sencillas modificaciones del habitual sistema CAS-agar, dando un paso adicional hacia la caracterización de bacterias sensibles a HDTMA.

Una elevada proporción de cepas de la colección correspondiente al género *Pseudomonas* fue capaz de solubilizar fosfato tricálcico, dicálcico o incluso ambos. Numerosos géneros bacterianos han sido descritos como solubilizadores de sales de fosfato, siendo los más frecuentemente documentados *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Xanthomonas*, entre otros (Kuhad *et al.*, 2011). Uno de los más destacados es *Pseudomonas*, ya que se ha demostrado su habilidad para solubilizar diferentes tipos de fosfato inorgánico, incluidos los dos anteriormente mencionados, hidroxapatita (Illmer y Schinner, 1992), AlPO_4 y FePO_4 (Fankem *et al.*, 2008), siendo estos tres últimos altamente insolubles. Cabe destacar que muchas cepas solubilizadoras de fosfato cálcico pertenecientes a este género han sido aisladas de la rizosfera de numerosas especies vegetales, entre las que se incluyen especies leñosas como manzano (Sharma *et al.*, 2017), olivo (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a), e incluso de suelos forestales (Illmer y Schinner, 1992).

Por otro lado, cabe mencionar que no pudo apreciarse un paralelismo absoluto entre la capacidad de cada cepa de solubilizar uno y otro tipo de fosfato cálcico. Es decir, la mayoría de las cepas solubilizadoras de fosfato tricálcico fueron además capaces de disolver el CaHPO_4 del medio (a excepción tan solo de p3), sin embargo nueve cepas solubilizadoras de fosfato dicálcico no mostraron tal habilidad en cuanto a la sal tricálcica se refiere. Estos resultados se encuentran en línea con los reportados por Guglielmetti y colaboradores (2013), quienes destacaron que *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM19603^T forma un halo transparente cuando crece en un medio de cultivo suplementado con CaHPO_4 , pero no así cuando se suplementa con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. En la actualidad se conocen diferentes mecanismos mediante los cuales las bacterias son capaces de mejorar la solubilidad de diferentes fosfatos inorgánicos, destacando la producción de ácidos orgánicos de diversa índole (Sharma *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, el modo de actuación específico sobre los diferentes tipos de fosfato cálcico no ha sido descrito aún, aunque este merecería ser estudiado en trabajos futuros al objeto de profundizar en las habilidades metabólicas de estas cepas. Por otro lado, los diferentes resultados obtenidos para las dos fuentes de P inorgánico son muestra, una vez más, de la plasticidad metabólica característica de este género bacteriano.

Por el contrario, ninguna de las 17 cepas pertenecientes al género *Luteibacter* fue capaz de formar halos o zonas de aclaramiento en los medios de cultivo suplementados con los distintos tipos de fosfato cálcico analizados, a diferencia de la cepa empleada como referencia positiva. Estos resultados contrastan parcialmente con los obtenidos para una cepa de la especie *L. rhizovicius* la cual tampoco fue capaz de solubilizar fosfato tricálcico pero sí CaHPO_4 (Guglielmetti *et al.*, 2013). Si bien la cepa

Resultados

analizada por los autores citados fue capaz de crecer y solubilizar dicho fosfato en un medio mínimo, en el presente trabajo fue necesaria la inclusión de extracto de levadura para lograr el desarrollo bacteriano. La solubilización de los diferentes tipos de fosfato de calcio fue ensayada a concentraciones de 5 y 0.5 g/L de extracto de levadura por tratarse, respectivamente, de la concentración empleada en la formulación del medio YED-P original (Peix *et al.*, 2001), así como la mínima en la que se pudo apreciar crecimiento de las 17 cepas de este género. Cabe destacar que algunos autores han demostrado previamente que el extracto de levadura a una concentración superior a 0.5 g/L puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la solubilización de fosfato tricálcico en el caso de una cepa del género *Pseudomonas* (Nautiyal, 1999). En otro trabajo también ha sido observada una disminución de la eficiencia de solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de varias cepas de dicho género en el medio YED-P original con respecto a la observada cuando la concentración de dicho componente era 10 veces inferior (Aarab *et al.*, 2015). Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se caracterice fenotípicamente el género *Luteibacter*, y ninguno que describa el posible efecto inhibitorio del extracto de levadura sobre la solubilización de fosfato tricálcico o dicálcico. Así pues, teniendo en cuenta todo lo anterior no es posible concluir si la ausencia de halos alrededor de las colonias correspondientes a las cepas del género *Luteibacter* fue debida a su incapacidad de solubilizar cualquiera de los fosfatos inorgánicos empleados, o si bien este proceso metabólico se vio inhibido dada la presencia del extracto de levadura. Así pues, sería conveniente esclarecer en el futuro dicho aspecto para poder lograr la caracterización detallada de las 17 cepas estudiadas, esencial para el hipotético desarrollo de bioformulaciones basadas en dichas bacterias.

Una de las fitohormonas más comunes implicadas en la mediación de la respuesta vegetal a diferentes tipos de estrés es el etileno. El enzima ACC deaminasa desempeña un papel crucial en la mitigación del estrés en las plantas. Diferentes especies pertenecientes a multitud de géneros bacterianos son capaces de producir este enzima, aunque Glick (2005) destaca que aquellas pertenecientes al género *Pseudomonas* son las típicamente estudiadas en el caso de las bacterias de vida libre. Tal es así que la actividad de este enzima ha sido puesta de manifiesto para diversas especies como *P. oryzae* (Belimov *et al.*, 2001), *P. brassicacearum* (Belimov *et al.*, 2001), *P. bathycetes*, *P. chlororaphis*, *P. syringae* (Nadeem *et al.*, 2007), *P. tolaasii* (Dell'Amico *et al.*, 2008), *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* (Zahir *et al.*, 2009), *P. putida* (Nascimento *et al.*, 2013) entre otras. Para alguna de ellas se ha demostrado su efecto protector frente a diferentes tipos de estrés sufridos por distintos hospedadores vegetales, incluyendo plantas leñosas como *Pinus sabiniana* (Nascimento *et al.*, 2013). Sin embargo, ninguna de las cepas aisladas de la rizosfera de roble melojo fueron capaces de crecer empleando ACC como única fuente de N, siendo por tanto esperable que su capacidad para aliviar el efecto de diferentes tipos de estrés sobre las plantas sea minoritaria por esta vía. Así pues, las cepas aisladas de la rizosfera de roble melojo representan una excepción de la capacidad de producir el mencionado enzima que de forma generalizada es documentada para bacterias rizosféricas de este género.

Mediante los mecanismos revisados anteriormente (Apartado 2.2.2.2.), las PGPB son capaces de mejorar la biodisponibilidad de ciertos nutrientes así como de estimular el desarrollo radicular de los hospedadores vegetales, contribuyendo por tanto a una mejor absorción de los nutrientes y por consiguiente a un estado nutricional

óptimo. Así, se estudió el efecto de 15 cepas sobre *M. sativa* en condiciones gnotobióticas. Ocho cepas (p19, p24, p34, p48, p52, p61, L5, L7) fueron capaces de mejorar significativamente el peso seco de las plantas de alfalfa. Estas fueron capaces de solubilizar fosfato y/o producir sideróforos, por lo que una mejor absorción del P y/o del Fe^{3+} podría conducir a una mayor producción primaria y consecuentemente a un mayor peso de la parte aérea, tal y como sugieren Daur y colaboradores (2018). Cabe destacar que dos de las ocho cepas que supusieron un incremento del valor de todos los parámetros vegetales evaluados, se encontraban adscritas al género *Luteibacter* (L5, L7). Aunque este género se encuentra en la actualidad poco estudiado, el efecto positivo de la inoculación de una cepa de la especie *L. rhizovicius* sobre plantas de cebada ha sido ya documentado (Guglielmetti *et al.*, 2013). A pesar de que en este y aquel estudio se trabajó con hospedadores vegetales diferentes, los resultados de la inoculación de las cepas L5 y L7 se encuentran en línea con los descritos por aquellos autores, observándose en ambos casos un incremento del peso de la parte aérea en comparación con plantas no inoculadas.

Si bien el efecto positivo de bacterias con habilidad de mejorar la disponibilidad de elementos como P, N, Fe, K, etc. sobre el *fitness* general de las plantas ha sido demostrado para numerosos cultivos incluida la alfalfa (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2002; Turan *et al.*, 2014), debe recalarse que las cepas p2, p14 y p54 productoras de sideróforos y solubilizadoras de fosfato no fueron capaces de promover el crecimiento de *M. sativa* en términos de peso (fresco o seco) de la parte aérea y altura del tallo, en las condiciones ensayadas. Por el contrario, cuando las plantas fueron inoculadas con la cepa p52 (carente de las mencionadas propiedades *in vitro*, aunque capaz de sintetizar IAA y/o sus equivalentes) pudo apreciarse un incremento considerable de los tres parámetros medidos. En la misma línea de argumentación debe destacarse que la cepa p14 – cuyo efecto fue aparentemente neutro sobre los parámetros fisiológicos medidos – resultó productora de compuestos indólicos, al igual que otras cuya inoculación supuso una mejora de las propiedades de *M. sativa* analizadas. En definitiva, todo ello en conjunto sugiere que además, otros mecanismos no considerados en este trabajo podrían verse implicados en la estimulación del crecimiento vegetal. Otros autores han achacado dicho efecto positivo a la síntesis de ciertos reguladores del crecimiento como citoquininas o giberelinas en el caso de PGPB adscritas al género *Pseudomonas* (Kang *et al.*, 2014; Pandya y Desai, 2014). Por ejemplo, la síntesis de giberelinas podría explicar el incremento de la altura del tallo apreciado para 12 de los tratamientos aplicados. Sin embargo, con el diseño experimental seguido no es posible contrastar dicha hipótesis, proponiéndose para un futuro la evaluación de la capacidad de síntesis de otros reguladores que pudieran explicar la mejora del crecimiento de *M. sativa* aquí observada.

Sin embargo, cuando las cepas *Pseudomonas* sp. p48, *Luteibacter* L7 y el consorcio formado por ambas fueron inoculados en condiciones no gnotobióticas sobre bellotas de roble melojo y encina, no se observó en ningún caso una mejora significativa de la altura del tallo, peso fresco o seco de la parte aérea respecto a las plantas control. De esta manera, tuvo lugar una respuesta diferencial en el caso de la especie leguminosa *M. sativa* y las quercíneas consideradas. Habitualmente se considera que las PGPB son capaces de estimular el crecimiento de todas las especies con las que establecen interacciones, debido, por un lado, a la conservada influencia de los

reguladores del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de las plantas. Sin embargo, al igual que en otros estudios (Long *et al.*, 2008), en el presente trabajo no se observó la misma respuesta en las tres especies analizadas. Debe mencionarse que si bien en el caso de *M. sativa* los ensayos fueron realizados en condiciones gnotobióticas, el efecto sobre las quercíneas fue estudiado tras la desinfección de las bellotas y en condiciones menos controladas. Cuando prevalece la esterilidad, no existe competencia entre las bacterias inoculadas y otros microorganismos, por lo que estas pueden establecerse más fácilmente. Sin embargo, en un suelo natural no estéril, las bacterias inoculadas deben enfrentarse a uno de los ecosistemas terrestres microbiológicamente más diverso (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018b). Aunque las bellotas de *Quercus* spp. fueron desinfectadas de forma previa a la inoculación, posiblemente la carga microbiana inicial de las mismas no fue reducida completamente, pudiendo residir aún sobre las mismas otros microorganismos. Asimismo, durante el crecimiento de las plantas estas fueron mantenidas en condiciones no estériles, por lo que no sería de extrañar que las bacterias inoculadas tuvieran que competir con otros microorganismos por los nutrientes y el nicho ecológico. De esta manera se reduciría su efecto beneficioso sobre las quercíneas, a diferencia de lo esperado en el caso de los ensayos en condiciones gnotobióticas. Por otro lado, dado que el éxito de la colonización de las raíces por las PGPB se encuentra vinculado a un incremento del crecimiento y del *fitness* de muchos hospedadores vegetales (Benizri *et al.*, 2001), podría pensarse que las cepas p48 y L7 son capaces de colonizar más eficientemente las raíces de alfalfa que las de las quercíneas. Sin embargo, dicho fenómeno sería digno de estudio ya que en el último caso se incluye el hospedador natural de ambas cepas, *Q. pyrenaica*. Otros autores apuntan a que el diferente comportamiento de las bacterias inoculadas sobre los hospedadores naturales y sobre plantas no hospedadoras puede verse condicionado por las diferentes condiciones ambientales bajo las que dichas plantas se desarrollan. Así, la co-evolución bacteria-planta dependiente de hábitat podría determinar las comunidades bacterianas que mejor se adaptan a un nicho concreto, y por ende que mejor desempeñan su función (Long *et al.*, 2008).

Los taninos son el cuarto constituyente más abundante de la biomasa vegetal, tan solo por detrás de la celulosa, hemicelulosa y la lignina. Dichos compuestos polifenólicos contienen una elevada cantidad de grupos hidroxilo en su estructura, tendiendo a formar complejos estables con proteínas y aminoácidos, y resultando por tanto difícilmente degradables (Chowdhury *et al.*, 2004). Algunos taninos son ciertamente recalcitrantes a la degradación o tienen incluso efecto antimicrobiano, si bien otros inhiben enzimas degradadores y por tanto inducen un retraso en los procesos de descomposición de la materia orgánica (Bhat *et al.*, 1998). Sin embargo, su degradación no es del todo imposible, pudiendo ser hidrolizados por enzimas como tanasas de origen microbiano. Aunque la degradación de taninos por parte de cepas adscritas al género *Pseudomonas* es conocida desde hace tiempo (Basaraba, 1966; Deschamps, 1989; Chowdhury *et al.*, 2004), ninguna de las 44 cepas rizosféricas fue capaz de utilizar ácido tánico como fuente única de C. Esta aparente falta de actividad degradativa resultó inesperada, dado el versátil metabolismo que caracteriza al género *Pseudomonas*, y dada su conocida capacidad para degradar compuestos fenólicos (Hasan y Jabeen, 2015). Por el contrario, todas las cepas pertenecientes a este género crecieron con normalidad en medio LB suplementado con ácido tánico, si bien la concentración máxima tolerada dependió de la cepa considerada. Debe tenerse en

cuenta además que los taninos son frecuentes en la raíz, corteza y hojas de algunas leñosas como las quercíneas (Bhat *et al.*, 1998; Kwaśna, 2004), de donde las cepas en estudio fueron aisladas. Por lo tanto, la ausencia de toxicidad del ácido tánico e incapacidad para utilizarlo como fuente de C sugiere que estas podrían haber desarrollado sistemas para tolerarlo y que quizá podrían utilizar los productos de degradación del mismo generados por otros organismos capaces de descomponerlo. Incluso no puede descartarse que dichas cepas tengan la capacidad de actuar sobre las ramificaciones o incluso sobre otro tipo de taninos. Existen varios mecanismos asociados a la detoxificación de este tipo de compuestos, entre los que destaca la oxidación de los mismos mediada por polifenol oxidasas, la cual se encuentra asociada a la formación de un producto de color pardo-negro oscuro (Chowdhury *et al.*, 2004). Cabe destacar que en torno a las colonias de aquellas cepas capaces de crecer en medio LB suplementado con 2 ó 5 mg/mL fue posible observar un oscurecimiento del medio de cultivo (ver Figura VI.5), lo cual podría verse explicado por tanto por la oxidación del ácido tánico vinculada a la detoxificación del mismo. Así pues, las cepas tolerantes a 2 ó 5 mg/mL de ácido tánico podrían ser *a priori* aplicadas en un nicho ecológico como el dominado por individuos del género *Quercus*, dada su aparente adaptación metabólica que les permite tolerar tales concentraciones de un compuesto con propiedades antimicrobianas y rico en el mencionado hábitat. Por otro lado, ante la variabilidad intragenérica observada en cuanto al rango de concentraciones del tanino toleradas, se recomienda la realización de estudios como el llevado a cabo aquí para facilitar la supervivencia de los inoculantes bacterianos y mejorar por tanto la eficiencia de las bioformulaciones.

Las 17 cepas del género *Luteibacter* resultaron tolerantes a ácido tánico en medio YEM. Debido a la incapacidad de las mismas para crecer en medio mínimo (ni tan siquiera en presencia de glucosa), fue imposible determinar si estas tienen la habilidad de utilizar el tanino como única fuente de C. Debe remarcarse que otras cepas de la especie *L. rhizovicinus* aisladas de suelo bajo la influencia de las raíces de sauce (*Salix caprea*) son capaces de degradar derivados fenólicos (Leigh *et al.*, 2006), por lo que no resultaría del todo sorprendente que las 17 cepas analizadas en este trabajo fueran capaces de descomponer compuestos fenólicos. Sin embargo, tampoco es descartable que estas cepas sean incapaces de degradar el ácido tánico dado que fueron aisladas del interior de las raíces de *Q. pyrenaica*, donde no es esperable que se encuentren expuestas a ácido tánico.

Algunas bacterias tienen la habilidad de sintetizar compuestos con actividad antimicrobiana. Un ejemplo son los enzimas extracelulares que actúan sobre diferentes componentes de la pared celular de hongos y oomicetos. Algunos de los enzimas más estudiados son proteasas, celulasas de diferente índole y quitinasas, habiéndose documentado ya el papel de ciertas proteasas expresadas por bacterias del género *Pseudomonas* en la inhibición del crecimiento de diversos hongos (Illakkiam *et al.*, 2013). A pesar de ello, del total de las 18 cepas de este género que sintetizaron proteasas en el medio de cultivo SMA, tan solo *Pseudomonas* sp. p53 fue capaz de inhibir el crecimiento de los hongos estudiados. Por el contrario, la cepa p2 (posiblemente perteneciente a la misma especie) no demostró actividad proteolítica en el medio SMA pero fue capaz de antagonizar también el crecimiento de todos los hongos en estudio. Inversamente, para otras bacterias productoras de enzimas proteolíticos

Resultados

(cepas L7 y L10 del género *Luteibacter*) no fue posible observar inhibición del crecimiento de ninguno de los hongos ni del oomiceto en estudio, no siendo posible por tanto confirmar el papel de las proteasas en el antagonismo de *B. mediterranea*, *D. corticola* y *A. mellea*. Dichos resultados además demuestran la variabilidad metabólica de las cepas analizadas incluso a nivel infraespecífico.

La pared celular fúngica se encuentra compuesta por varias capas o láminas, compartiendo muchas especies la composición de la más interna, característica por su contenido en diferentes tipos de glucanos y quitina (Gow *et al.*, 2017). Atendiendo a la producción de quitinasas – evaluada mediante ensayos fluorimétricos (Capítulo V) – destaca la falta de vinculación entre la expresión de dichas enzimas y el antagonismo de los hongos estudiados. Aunque 11 de las 61 cepas bacterianas fueron capaces de producir quitinasas (Tablas V.2 y V.3), ninguna de ellas inhibió en los cultivos duales el crecimiento de ni tan siquiera uno de los hongos estudiados. Cabe destacar que en aquel caso la actividad de los enzimas fue estudiada en las condiciones óptimas de actuación de los mismos, siendo relativamente bajos los títulos de actividad de la quitinasa para la mayoría de las cepas quitinolíticas. A su vez, debe tenerse en cuenta que el medio de cultivo y las condiciones empleadas para el estudio de los perfiles enzimáticos (ME, cultivo líquido) no fueron exactamente las mismas que las contempladas en los ensayos de enfrentamiento microbiano (PDA, MEA, cultivo estático). Teniendo en cuenta que la actividad enzimática en ocasiones puede ser diferente en función de la fuente de C, N, así como del pH y la temperatura definida para el crecimiento bacteriano (Sepahy y Jabalameli, 2011), no sería de extrañar que las quitinasas detectadas mediante los ensayos fluorimétricos no fueran expresadas durante los ensayos de enfrentamiento microbiano.

No obstante lo anterior, el presente trabajo no es el primero que informa sobre la ausencia de correlación entre la producción de enzimas extracelulares y el antagonismo fúngico o de oomicetos en cultivos duales. Sindhu y Dadarwal (2001) observaron un fenómeno similar al aquí descrito al enfrentar varias cepas celulolíticas y quitinolíticas del género *Pseudomonas* a *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*. Así pues, teniendo en cuenta la ausencia de correlación teórica entre la producción de enzimas extracelulares y la inhibición fúngica apreciada en cultivos duales, se podría especular sobre la existencia de uno o varios mecanismos alternativos de inhibición fúngica no considerados en este trabajo. Si bien hasta donde nuestro conocimiento alcanza prácticamente no existen trabajos que contemplen el potencial antagonístico del género *Luteibacter*, el caso de *Pseudomonas* es totalmente opuesto. La cantidad de metabolitos antimicrobianos producidos por este último género es considerable, destacando por su papel en el biocontrol de diferentes patógenos las fenacinas (Mavrodi *et al.*, 2013), floroglucinoles (Keel *et al.*, 1992), pioluterina (Nowak-Thompson *et al.*, 1999), pirrolnitrina (Dikin *et al.*, 2007), ácido cianhídrico, (Laville *et al.*, 1998) lipopéptidos cíclicos (Raaijmakers *et al.*, 2006), viscosinamida (Nielsen *et al.*, 1999), bacteriocinas (Loper *et al.*, 2012), o toxinas que contribuyen a la protección entomopatogénica de los hospedadores vegetales (Olcott *et al.*, 2010), entre otros compuestos. Además, el antagonismo de organismos patógenos puede ser consecuencia de mecanismos directos (como la síntesis de compuestos antimicrobianos) o indirectos (e.g., síntesis de sideróforos mediante los cuales compiten por el Fe^{3+} con los patógenos) que no tienen por qué ser mutuamente excluyentes. Por consiguiente, el efecto antagonístico puede ser

una consecuencia de la combinación de varios tipos de mecanismos. Así, aunque no fue posible esclarecer la estrategia específica mediante la cual las cepas *Pseudomonas* sp. p2 y p53 inhibieron el crecimiento de los hongos estudiados, no sería de extrañar que la actividad antagonica fuera debida a la síntesis de sustancias antimicrobianas o compuestos bioactivos similares a los mencionados, o incluso a una combinación de mecanismos no contemplados aquí.

Por otro lado, debe remarcarse que ninguna de las cepas bacterianas analizadas mostró actividad antagonica frente a *P. cinnamomi*. La pared celular de este oomiceto se encuentra compuesta mayoritariamente por celulosa (detectándose por lo tanto enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 4) entre unidades de D-Glucosa), así como por un glucano amorfo característico por sus enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 6) (Bartnicki-Garcia, 1966; Zevenhuizen y Bartnicki-Garcia, 1969). A su vez, proteínas y lípidos componen también la pared celular de las hifas de dicho oomiceto, siendo el contenido en glucosamina prácticamente despreciable (Bartnicki-Garcia, 1966). Destaca por lo tanto que ninguna de las 38 cepas productoras de endoglucanasas fuera capaz inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*, dada la actividad hidrolítica de dichos enzimas sobre los enlaces β -D-(1 \rightarrow 4) glicosídicos típicos de la celulosa y de otros β -D-glucanos que contienen enlaces β -(1 \rightarrow 3) (Scheer *et al.*, 2011). Resulta aún más llamativa la ausencia de antagonismo por parte de las cepas p9, p20, p34, p49 y p54 del género *Pseudomonas* así como de las 17 correspondientes a la colección de *Luteibacter* dada su capacidad para producir los tres enzimas implicados en la degradación de celulosa (exocelulasa o celobiohidrolasa, β -glucosidasa y endoglucanasa) y aquel que actúa sobre los lípidos, esto es, lipasa. Además, todas las cepas mencionadas sintetizaron sideróforos, y de ellas L7 y L10 resultaron además productoras de proteasas, pero no antagonistas. Teniendo en cuenta todo lo anterior, podría especularse sobre la ausencia de expresión o baja actividad de los enzimas extracelulares en el cultivo dual, o más probablemente sobre la necesidad de otras estrategias bacterianas para el biocontrol de dicho microorganismo fitopatógeno. Otros autores han demostrado previamente que bacterias con un fenotipo similar a L7 y L10 son capaces de inhibir *in vitro* el desarrollo de *P. cinnamomi* (Gómez Lama-Cabanás *et al.*, 2018b), sugiriendo que aquellas bacterias actúan sobre el mencionado oomiceto mediante otro tipo de mecanismo aquí no contemplado. Syed-Ab-Rahman y colaboradores (2018) demostraron que bacterias antagonistas de *P. cinnamomi* eran capaces de producir dicetopiperazinas, metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos incluidos oomicetos del género *Phytophthora* (Puopolo *et al.*, 2014), lo cual apoyaría la hipótesis planteada.

A tenor de la cantidad de especies diferentes adscritas al género *Pseudomonas* que muestran efecto antagonico frente a múltiples hongos causantes de diversas enfermedades vegetales, el potencial de los miembros de este género como BCA es incuestionable. El efecto antagonico de diferentes especies sobre hongos que afectan negativamente a plantas herbáceas de interés agrícola ha sido demostrado previamente, según revisó Mercado-Blanco (2015). La presencia de bacterias pertenecientes a este género en ciertos suelos también ha sido relacionada con la supresividad natural de los mismos (Walsh *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2011). Incluso se ha documentado el efecto antagonico de una cepa de la especie *P. synxantha* aislada de la rizosfera de melocotonero sobre el nematodo fitoparasítico *Mesocriconema xenoplax* (Kluepfel *et al.*, 2002). Igualmente, el papel de diferentes

Resultados

cepas del género *Pseudomonas* en el biocontrol de hongos que afectan a especies arbóreas ha sido ya contrastado, como en el caso de la verticilosis del olivo ocasionada por el hongo *Verticillium dahliae* (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a), o el antagonismo que ejerce *P. pseudoalcaligenes* sobre *Rosellinia necatrix*, hongo causante de la podredumbre de la raíz de plantas de aguacate (Pliego *et al.*, 2007), entre otros ejemplos.

Sin embargo, la posibilidad de emplear bacterias para el control biológico de hongos que afectan a quercíneas se encuentra poco estudiada. La inhibición del crecimiento y de la formación de rizomorfos de *A. mellea* observada para las cepas p2 y p53 no resultó completamente novedosa dado que en otros trabajos se ha descrito el efecto antagónico de ciertas cepas (algunas pertenecientes a la especie *P. fluorescens*) sobre el crecimiento del basidiomiceto *A. ostoyae* (Dumas, 1992). Dichos autores demostraron además el impacto negativo de las mismas sobre la formación de rizomorfos de *A. gallica*. En el caso concreto de la especie *A. mellea*, previamente ya ha sido documentado el efecto inhibitorio de las especies *P. aeruginosa* y *P. mendocina* sobre dicho basidiomiceto (Baumgartner y Warncok, 2006). Otros autores han descrito el antagonismo bacteriano sobre este hongo en condiciones *in vitro* e incluso ha sido documentada la protección bacteriana de plantas leñosas frente al mencionado patógeno vegetal. Concretamente, una cepa de la especie *P. fluorescens* resultó capaz de disminuir el número de plántulas de pino insigne (*Pinus radiata*) que manifestaban síntomas de enfermedad cuando eran co-inoculadas con ambos microorganismos (Mesanza *et al.*, 2016). Así, aquellas evidencias y los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que diferentes especies pertenecientes al género *Pseudomonas* tienen potencial para controlar a *A. mellea*. Sin embargo, el potencial de las cepas p2 y p53 observado *in vitro* debería ser evaluado *in planta* para confirmar el efecto protector de las mismas sobre los hospedadores vegetales.

Por el contrario, es la primera vez que se describe la inhibición bacteriana del crecimiento micelial de *B. mediterranea* y *D. corticola*. Previamente se ha contemplado la utilización de BCAs fúngicos frente a *D. corticola*, obteniéndose resultados positivos en cuanto a la inhibición del mismo por parte de diversos hongos aislados de robles en decaimiento (Campanile *et al.*, 2007). Si bien estos autores documentaron un efecto protector frente a *D. corticola* incluso en plantones de las especies forestales *Quercus cerris* y *Q. pubescens* cuando estos eran tratados con un hongo, en la actualidad se desconoce el efecto de BCAs bacterianos sobre el mencionado hongo fitopatógeno, incluso en condiciones *in vitro*. Más grave resulta la ausencia de trabajos relativos al control biológico del hongo *B. mediterranea*, no habiéndose registrado hasta el momento de escritura de esta Tesis ningún tipo de aproximación microbiológica con la que controlar el hongo causante del chancro carbonoso en quercíneas. Así pues, la inhibición de dicho hongo registrada para las cepas p2 y p53 constituye una primicia, siendo el potencial de las mismas merecedor de futuros estudios, dada la escasez de alternativas sostenibles para el control de *B. mediterranea*. No obstante, deben llevarse a cabo estudios *in planta* que confirmen la inhibición fúngica *in vitro* aquí documentada.

La búsqueda global de posibles BCAs frente a *P. cinnamomi* ha sido algo más intensa que la descrita para los tres hongos anteriores, probablemente debido al rango más amplio de hospedadores a los que afecta y a su gran virulencia especialmente

sobre especies forestales (Robin *et al.*, 2012). En el caso particular del género *Pseudomonas* se ha descrito que algunas especies como *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* (Broadbent *et al.*, 1971; Cazorla *et al.*, 2006), *P. indica*, e incluso otras especies no conocidas son capaces de inhibir el crecimiento de dicho oomiceto (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a; Ramírez-Gil *et al.*, 2014). Sin embargo, a diferencia de lo observado para los hongos, ninguna de las 61 cepas estudiadas fue capaz de inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*, ni tan siquiera las cepas p2 y p53. Por tanto, ambas cepas bacterianas podrían considerarse de gran interés como posibles BCAs de medio espectro, dado su potencial para inhibir el crecimiento de tres especies fúngicas que afectan a plantas de relevancia forestal.

Por otro lado, debe puntualizarse que el bajo porcentaje registrado de cepas (3.3%) con capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos aquí estudiados no debería considerarse completamente sorprendente. Las 61 cepas bacterianas fueron aisladas a partir de la raíz de individuos de *Q. pyrenaica* adultos de gran porte, o jóvenes provenientes en su origen de un vivero (zonas HAF y NPF, respectivamente). Ninguno de los árboles muestreados exhibía síntoma alguno de las enfermedades ocasionadas por *B. mediterranea*, *D. corticola*, *A. mellea* o *P. cinnamomi*, ni signos de haber sido afectados por dichos patógenos en el pasado. Tampoco se apreciaron signos de enfermedad en la vegetación acompañante ni en otros árboles próximos a los muestreados presentes en las áreas en estudio. Ello sugiere, por tanto, que las zonas HAF y NPF no han sido recientemente expuestas (o no en gran medida) a los patógenos estudiados, y que por tanto la probabilidad de encontrar bacterias capaces de inhibir el desarrollo de los mismos es reducida.

Desgranando dicha proporción de cepas con comportamiento antagónico, resulta llamativo el caso de la colección correspondiente al género *Luteibacter*, ya que no se detectó ninguna cepa capaz de limitar el crecimiento de ninguno de los microorganismos fitopatógenos estudiados. La literatura científica existente sobre el potencial antagónico o sobre los compuestos antimicrobianos producidos por bacterias de este género es prácticamente nula. Tan solo de Boer y colaboradores (2007) demostraron que una cepa adscrita a la especie *L. rhizovicius* es incapaz de inhibir el crecimiento de ciertos hongos fitopatógenos en cultivos duales. Sin embargo, llama la atención que cuando esta se combinó con bacterias de otros géneros y se enfrentaron todas ellas a los hongos, el efecto antagónico entonces apreciado fue considerable. El presunto efecto sinérgico documentado por dichos autores pone de manifiesto que el potencial papel antagónico de algunas bacterias aparentemente no inhibitorias es habitualmente ignorado cuando estas son enfrentadas individualmente a organismos fitopatógenos. Así, el desarrollo de bioformulaciones basadas en consorcios bacterianos es una de las tendencias seguidas actualmente en este contexto.

Para ello, es esencial descartar previamente cualquier tipo de interacción negativa entre las bacterias que forman parte del consorcio. En este caso pudieron observarse varios fenómenos de inhibición entre las cepas seleccionadas, si bien los resultados obtenidos dependieron del medio de cultivo en consideración (Tabla VI.3). Tal y como se ha mencionado anteriormente, las capacidades metabólicas bacterianas pueden depender fuertemente del medio de cultivo empleado para su crecimiento, debido probablemente a los diferentes factores nutricionales que componen los mismos.

Resultados

Gómez Lama-Cabanás y colaboradores (2018b) informaron previamente que este efecto no solo se da en el caso de enfrentar bacterias y hongos u oomicetos, sino también cuando se llevan a cabo co-cultivos bacterianos. De las cepas estudiadas, tan solo se detectaron incompatibilidades en el caso de *Pseudomonas* sp. p19 y p43 en los medios LB y YEM, respectivamente. Debe mencionarse que ambas fueron capaces de inhibir débil o intensamente el crecimiento de varias de las cepas testadas, lo cual inicialmente haría no deseable la inclusión en futuras bioformulaciones de p19 o p43 en combinación con dichas cepas. Por el contrario, el desarrollo de un consorcio basado en las cepas más prometedoras según los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica (e.g., p3, p14, p48 y p61) podría resultar viable, ya que *in vitro* no se detectaron incompatibilidades entre las mismas. En caso de confirmarse *in planta* el potencial de la cepa p2 como BCA, la combinación de la misma con p3, p14 o p48 podría ser igualmente factible dada la ausencia de interacciones negativas entre ellas. De esta manera se podría lograr un consorcio formado por cepas con distintos papeles funcionales y mediante el cual se pudiera complementar los diferentes requerimientos vegetales (nutricionales y de protección frente a hongos fitopatógenos).

La caracterización fenotípica realizada fue parte de un análisis preliminar que pretende sentar las bases para el futuro desarrollo de bioformulaciones basadas en PGPB y/o BCAs. Los resultados obtenidos revelaron que muchas de las cepas analizadas – tanto aquellas aisladas de rizosfera como de la endosfera de la raíz de *Q. pyrenaica* – tienen potencial para mejorar el desarrollo vegetal, aunque las cepas del género *Luteibacter* no pudieron ser completamente caracterizadas. En ese caso, los estudios realizados abren una nueva vía de investigación la cual debería comprender la puesta a punto de métodos específicos que permitan caracterizar más profundamente las 17 cepas de la mencionada colección bacteriana. Como *screening* preliminar que este trabajo representa, los resultados aportados dejaron ver el papel prometedor sobre el crecimiento vegetal de 12 de las cepas inoculadas sobre plantas de alfalfa, si bien el efecto de dos ellas y del consorcio bacteriano formado por las mismas no fue reiterado en quercíneas. Así pues, los resultados aquí obtenidos dan pie a la realización de numerosos ensayos en un futuro que permitan ahondar en las interacciones que tienen lugar entre las cepas asociadas a la raíz de *Q. pyrenaica* y dicho hospedador, así como en el aprovechamiento de las mismas para el desarrollo de bioinoculantes en el ámbito del manejo forestal integrado.

VI.5. Perspectivas futuras

Aunque el diseño experimental seguido estuvo principalmente dirigido hacia la caracterización fenotípica de las bacterias asociadas a la raíz de roble melojo, este a su vez representa un abordaje preliminar para la búsqueda de PGPB y BCAs a aplicar en individuos de la mencionada especie leñosa. Sin embargo, como corresponde a un estudio inicial, ciertos aspectos necesarios para el desarrollo de bioformulaciones eficaces no fueron abordados y deberían ser considerados en un futuro.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las cepas adscritas al género *Luteibacter* no fueron capaces de crecer en ningún medio de cultivo carente de extracto de levadura, lo que dificultó en gran medida la caracterización de esta colección bacteriana. Si bien en ese trabajo algunas alternativas a los sistemas frecuentemente

empleados para la caracterización de PGPB fueron implementadas, sería necesario seguir desarrollando estrategias con las que poder caracterizar al completo dicha colección. En este mismo contexto, otros mecanismos como la producción de metabolitos secundarios (antibióticos de diverso tipo, producción de compuestos volátiles, etc.) deberían ser evaluados para lograr una caracterización más profunda tanto de las 17 cepas del género *Luteibacter* como las 44 rizosféricas, descifrando así el auténtico potencial de las mismas.

La colonización exitosa de las raíces es un prerequisite para que las PGPB y los BCAs puedan promover el crecimiento y mejorar la salud de su hospedador vegetal. En determinados casos es necesario que la raíz sea colonizada para que tenga lugar la expresión de ciertos fenotipos relacionados con el biocontrol, por ejemplo la síntesis de antibióticos y la competición por nutrientes o por el nicho ecológico (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000). Así pues, al objeto de mejorar la eficiencia de posibles bioinoculantes, sería recomendable estudiar la capacidad de colonización de las raíces de las cepas seleccionadas, por ejemplo, mediante inoculación de las mismas previamente transformadas con el gen que codifique alguna proteína fluorescente (véase la proteína verde fluorescente GFP, *Green Fluorescent Protein*), y posterior evaluación de la colonización del sistema radicular mediante microscopía de fluorescencia.

La búsqueda de posibles BCAs es una tarea que aunque resulta muy atractiva y prometedora, requiere del desarrollo de un abordaje que integre múltiples aspectos. La caracterización de las bacterias asociadas a la raíz de roble melojo reveló el potencial de algunas de ellas para actuar como BCAs, sin embargo, ante esta posibilidad deberían tenerse en consideración ciertos aspectos no contemplados aquí. Los ensayos de antagonismo fúngico y del oomiceto *P. cinnamomi* tan solo fueron realizados en un único medio de cultivo (PDA o MEA), y tal y como se ha mencionado la síntesis bacteriana de metabolitos secundarios es altamente dependiente del medio y las condiciones de cultivo (Blom *et al.*, 2011). Tal es así que otros autores observaron que el fenotipo antagónico de bacterias filogenéticamente divergentes (entre las que se incluían varias cepas del género *Pseudomonas*) variaba en función del medio de cultivo considerado (Gómez Lama-Cabanás *et al.*, 2018a, 2018b). Destaca que entre las cepas analizadas por los mencionados autores se incluían varias del género *Pseudomonas*, siendo *P. cinnamomi* uno de los microorganismos fitopatógenos frente a los cuales se detectó un diferente comportamiento en términos de antagonismo en función del medio de cultivo. Así pues, el potencial antagónico de las cepas asociadas a la raíz de roble melojo no puede aún descartarse taxativamente. En aras de una búsqueda intensa de posibles BCAs basados en las dos colecciones bacterianas estudiadas, se deberían realizar ensayos de enfrentamiento en medios de cultivo adicionales con los que obtener una visión más completa del potencial de las cepas en estudio. Empleando el medio habitual de crecimiento de las bacterias (LB, YEM) sería posible conocer de forma más completa y certera la capacidad antagónica de las 61 cepas, e identificar quizá eventos de inhibición no observados en los medios PDA y MEA.

Tal y como se ha revisado, algunas bacterias aparentemente no antagónicas son capaces de inhibir el crecimiento fúngico cuando estas son aplicadas junto con otras cepas bacterianas (de Boer *et al.*, 2007). Podría por tanto resultar de interés la realización de ensayos de enfrentamiento *in vitro* de las cepas bacterianas en

Resultados

combinación, y los hongos o el oomiceto en estudio. Así, cepas que han podido ser ignoradas en base a los resultados obtenidos en los cultivos duales, pero que pudieran tener un efecto negativo sobre los microorganismos fitopatógenos considerados podrían ser incluidas como candidatas a BCAs. En cualquiera de las modalidades consideradas (cepas individualizadas o consorcios bacterianos), en última instancia se debería contemplar la realización de ensayos *in planta*. Los test *in vitro* únicamente demuestran las interacciones que tienen lugar en condiciones artificiales entre los microorganismos que son co-cultivados, siendo estas muy distantes respecto a las que se dan en campo en la mayoría de ocasiones. Además, algunos de los posibles mecanismos bacterianos que pueden regir la inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos son difíciles de analizar si no es mediante la realización de ensayos *in planta*, por ejemplo, la resistencia sistémica inducida o la competición por nutrientes o por el nicho ecológico. Por otro lado, es frecuente encontrar en la literatura ejemplos en los que no es posible apreciar un efecto protector frente a un patógeno cuando este y los posibles BCAs son co-inoculados en el hospedador vegetal, incluidas especies leñosas (Martin *et al.*, 2015). Dado que factores bióticos y abióticos relativos al nicho ecológico específico en el que el bioinoculante va a ser aplicado pueden afectar a la actuación del mismo, la eficiencia real los posibles BCAs debería ser demostrada estudiando la interacción tripartita microorganismo fitopatógeno-hospedador vegetal-BCA(s), fijando condiciones experimentales que fueran similares en la mayor medida de lo posible, al escenario natural. Sin embargo, debe remarcarse que previamente es necesario estudiar con detalle el patosistema en estudio.

En una línea similar de argumentación debe puntualizarse que los ensayos de inoculación bacteriana realizados sobre plantas de *M. sativa* en condiciones gnotobióticas fueron realizados tan solo en una ocasión, por lo que deberían repetirse al menos dos veces más para poder obtener suficiente soporte estadístico. Si bien con el diseño experimental seguido no puede confirmarse categóricamente el efecto promotor del crecimiento de las plantas de alfalfa observado para 12 de las cepas seleccionadas, los resultados mostraron una tendencia positiva que debería ser corroborada. Asimismo, el impacto de un consorcio bacteriano sobre *M. sativa* debería ser igualmente analizado. Por otro lado, se sugiere estudiar el efecto de la inoculación de las cepas estudiadas sobre *M. sativa* en condiciones no gnotobióticas, así como el efecto sobre las tres especies vegetales estudiadas en este trabajo, en condiciones naturales.

El gran potencial de las PGPB y los BCAs especialmente en agricultura ha suscitado un inmenso interés a nivel global, encontrándose gran parte de los mecanismos asociados a los efectos beneficiosos que este tipo de bacterias ejercen estudiados a nivel genético. En la actualidad muchos de los genes implicados en la síntesis de compuestos bioactivos o enzimas extracelulares, por ejemplo, se hallan bien caracterizados. Por otro lado, también son conocidos algunos de los genes relacionados con la patogenicidad y virulencia sobre mamíferos de cepas del género *Pseudomonas* (Gómez-Lama Cabanás *et al.*, 2018a). Teniendo en cuenta ambos aspectos, la secuenciación del genoma de las cepas candidatas que fueran seleccionadas podría proporcionar gran cantidad de información sobre el potencial como PGPB o BCA de las mismas, siendo posible además descartar dichas cepas en caso de detectar en el genoma genes relacionados con la patogenicidad de las mismas.



DISCUSIÓN GENERAL

La imagen muestra el tronco y un rebrote en un individuo de *Quercus pyrenaica*.

Fuente: Ana V. Lasa.

Los bosques son ecosistemas para los cuales se ha predicho e incluso constatado una notable sensibilidad al cambio global, encontrándose aquellos de la zona mediterránea especialmente en riesgo por el incremento de las temperaturas, la variación en el régimen de precipitaciones y el aumento en la frecuencia e intensidad de los incendios forestales. En líneas generales, es esperable que en dicha zona tenga lugar una consecuente falta de regeneración de los bosques, y asociada una disminución de la biodiversidad (Vericat y Piqué, 2012). Algunos autores apuntan que la pérdida de biodiversidad compromete la estabilidad de los ecosistemas ya que cuanto más diversos sean estos, más probable es encontrar especies capaces de adaptarse a condiciones cambiantes, y por tanto conservar la funcionalidad del ecosistema (Loreau *et al.*, 2002). Así pues, en el marco de la gestión adaptativa de los ecosistemas forestales, resulta prioritario llevar a cabo actuaciones con las que conservar la biodiversidad de los bosques mediterráneos. En este contexto, existe unanimidad en la comunidad científica sobre la necesidad de considerar los ecosistemas forestales de forma holística, lo cual desemboca en la integración de múltiples disciplinas para lograr el adecuado manejo de los bosques (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004; Lladó *et al.*, 2017; Maghnia *et al.*, 2019). Uno de los componentes de los ecosistemas terrestres (incluidos los forestales) que desempeña funciones esenciales en el mantenimiento de la multifuncionalidad de los mismos, es la microbiota. Tal y como se ha revisado anteriormente (Apartado 2.2.2.), las bacterias del suelo contribuyen en numerosos procesos ecológicos que en última instancia suponen un flujo de materia y energía entre los organismos del suelo, tanto en la superficie como bajo tierra. Así pues, en ecosistemas como los forestales, es importante considerar los holobiontes en su conjunto, en lugar de considerar los árboles y otras plantas como entidades individuales.

En el Espacio Natural de Sierra Nevada varias actuaciones de gestión forestal han sido implementadas, entre las que se encuentra la lucha contra los incendios forestales, y en especial la prevención de los mismos. En este escenario, el desarrollo de las denominadas áreas pasto-cortafuegos (Ruiz Mirazo, 2011) constituye un buen ejemplo de la concepción holística de la gestión del monte mediterráneo. En el presente trabajo se ha pretendido contribuir al desarrollo de una estrategia integrada de silvicultura preventiva, en aras de aprovechar en un futuro las interacciones que tienen lugar entre los rizobios y la flora forrajera naturalmente presente en el Espacio Natural de Sierra Nevada. Así pues, en primera instancia se llevó a cabo un estudio preliminar con el que se pretendió sentar las bases para la mejora de leguminosas forrajeras que podrían emplearse en las áreas pasto-cortafuegos. Por lo tanto, primeramente se aislaron y caracterizaron a varios niveles los endosimbiontes de ciertas leguminosas adscritas a los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium*, que forman parte de la flora forrajera típica en Sierra Nevada. Tal y como se recoge en el Capítulo I, este estudio demostró la gran diversidad de las cepas aisladas pese a compartir el mismo origen geográfico. Dicha diversidad fue manifiesta tanto a nivel genotípico, como génico, a tenor del elevado número de tipos diferentes de los genes *housekeeping* estudiados, e incluso del gen *rrs*. Aunque todas se encontraban estrechamente relacionadas con el grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum*, ninguna pudo ser clasificada a nivel de especie, pudiendo pertenecer algunas de ellas a nuevas especies de este género. Así pues, los resultados de este estudio corroboran, por un lado, la riqueza de especies del género *Rhizobium* previamente descrita y apoyada por multitud de trabajos (Euzéby, 1997; Aoki *et al.*, 2010). Por otro lado, los resultados aquí obtenidos suponen un nuevo

aporte a la taxonomía de este género, ya que podrían suponer el engrosamiento de la lista de especies adscritas al mismo. Además, en caso de tratarse de nuevas especies, quedaría demostrado que las leguminosas *Vicia* spp., *Lathyrus* spp. y *Trifolium* spp. no solo son noduladas por las especies de rizobios típicamente documentadas en la literatura (*R. pisi*, *R. fabae*, *R. laguerreae*, *R. acidisoli*, etc.; ver Capítulo I), sino que pueden suponer un importante reservorio de diversidad genotípica y taxonómica. Por otro lado, aunque ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de nodular las seis especies vegetales estudiadas, todas ellas pertenecieron a uno de los dos simbiovares típicamente noduladores de las plantas forrajeras de interés para el ganado aquí analizadas (*viciae* o *trifolii*). Este hecho junto con la gran diversidad del gen *nodC* y la capacidad de nodulación cruzada observada para las seis cepas estudiadas sugieren que los rizobios considerados podrían tener la capacidad de nodular diferentes plantas de las tribus Fabeae o Trifolieae. Dicho atributo sería de gran interés para la industria de los bioinoculantes al poderse tratar de cepas noduladoras de un rango de hospedadores de medio espectro. Uno de los aspectos que caracterizan a los bioinoculantes ideales es la adaptación de las bacterias incluidas en su formulación a diversas condiciones ambientales, así como la interacción de las mismas con varios hospedadores diferentes (Kaminsky *et al.*, 2019). Por consiguiente, las cepas pertenecientes a los simbiovares *viciae* y *trifolii* capaces de nodular varias especies leguminosas podrían ser buenas candidatas a explorar en un futuro en este ámbito. En el caso de confirmarse dicha tendencia, el sistema leguminosa-rizobio considerado en este trabajo podría resultar de gran aplicabilidad en los planes de mejora de pastos, destinados por ejemplo al adecuado mantenimiento de las áreas pasto-cortafuegos de Sierra Nevada. Ello radica en que en los Espacios Protegidos es aconsejable el empleo de fertilizaciones orgánicas entre las que destaca el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno. Al mismo tiempo, en estos enclaves el empleo de plantas forrajeras debe restringirse a especies autóctonas (Ruiz Mirazo, 2011), tal y como se contempla en este trabajo de investigación.

En otro orden de cosas, la pertenencia de muchos de los rizobios considerados a diferentes linajes filogenéticos según el gen *housekeeping* analizado, puso de manifiesto que el estado taxonómico del género *Rhizobium* debe ser revisado en un futuro. La identidad taxonómica de las cepas estudiadas debería ser resuelta a nivel infragenérico en caso de desear aplicar en un futuro los conocimientos generados en este trabajo en los planes de mejora de la flora forrajera de Sierra Nevada, por ejemplo, para su mejor control y monitorización. Si bien en este estudio se obtuvieron resultados prometedores especialmente en el ámbito de la taxonomía del género *Rhizobium*, debe remarcarse que estos tan solo forman parte de un estudio preliminar con el que sentar las bases de este tipo de actuaciones respetuosas con el medio ambiente. Por lo tanto, queda abierta una vía complementaria de investigación en el ámbito de la silvicultura preventiva basada en el empleo de las áreas pasto-cortafuegos y la flora forrajera típica del Espacio Natural de Sierra Nevada.

La gestión adaptativa de los montes mediterráneos incluye también actuaciones de repoblación forestal, por ejemplo, con especies arbóreas cuyos bosques sufren algún tipo de alteración (Aspizua *et al.*, 2012). Un claro ejemplo de deterioro de las masas boscosas es el estado en el que se encuentran los melojares nevadenses, especialmente si se tiene en cuenta que *Q. pyrenaica* es una especie relictica de épocas

frías en Sierra Nevada. Como se ha comentado a lo largo de esta memoria de Tesis, la mitigación de la degradación de los bosques puede ser lograda mediante el manejo de la microbiota autóctona, siendo una de las principales estrategias la inoculación de las plantas con individuos de la microbiota rizosférica (Maghnia *et al.*, 2019). Así, el desarrollo de bioinoculantes comienza por la búsqueda de los mejores candidatos. Gran parte de la eficiencia de este tipo de productos depende de la capacidad de establecimiento de sus constituyentes bacterianos en el nicho donde van a ser aplicados o donde estos van a residir o ejercer su función. En el caso del hábitat edáfico, es recomendable que las bacterias inoculadas sean capaces de adaptarse o hacer frente a bacteriófagos, depredadores microbianos y otros organismos y condiciones abióticas que pueden comprometer su supervivencia, por lo que generalmente se recomienda explorar la microbiota nativa, adaptada a los factores bióticos y abióticos de dicho hábitat (Kaminsky *et al.*, 2019). Por ello, en aras de que los conocimientos generados en esta Tesis puedan ser aplicados en un futuro para la mejora del estado general de *Q. pyrenaica*, en primer lugar se procedió al estudio de las comunidades procariotas que de forma natural habitan la rizosfera de roble melojo. Para ello se tuvieron en cuenta tanto la población procariota total como la potencialmente activa, frecuentemente descartada en los estudios de descripción del procarioma vegetal. Tal y como se discute en el Capítulo II, la inmensa mayoría del *core* procarioma o procarioma esencial de la rizosfera de robles de diferente edad y que conforman distintos tipos de formaciones se encuentra representada por una cantidad relativamente baja de OTUs muy abundantes. Dichos resultados, aun habiendo sido obtenidos a nivel local, coinciden con las observaciones de Delgado-Baquerizo y colaboradores (2018) sobre las comunidades bacterianas del suelo a escala mundial. Así pues, el enclave de Sierra Nevada – y en concreto la rizosfera de *Q. pyrenaica* – podría considerarse una muestra representativa de la distribución global de las bacterias en el suelo, donde tan solo un número relativamente bajo de OTUs muy abundantes dominan el hábitat estudiado. Dichas coincidencias permiten plantear la cuestión sobre si Sierra Nevada – y en concreto los melojares – podría ser un enclave ideal para el análisis del procarioma forestal a nivel general, al igual que este sistema montañoso ha sido considerado como excelente observatorio del impacto del cambio global, a escala mundial (Aspizua *et al.*, 2012).

Tradicionalmente los estudios que se centran en la descripción de la diversidad y los perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas asociadas a plantas han profundizado fundamentalmente en las poblaciones totales, analizando exclusivamente la secuencia del gen *rrs*, esto es, a nivel de DNA (Lundberg *et al.*, 2012; Peiffer *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015; Zarraonaindia *et al.*, 2015; Coleman-Derr *et al.*, 2016). Debe resaltarse además la habitual frecuencia con la que las bacterias poco abundantes (aquellas que forman parte de la biosfera rara) son descartadas de la mayoría de los estudios, incurriendo estos en la creencia de la baja contribución de las mismas en el hábitat en el que residen por ser minoritarias. Sin embargo, tal y como se ha discutido anteriormente (Capítulo II), la biosfera rara podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la diversidad y la resiliencia de las comunidades procariotas. En el presente trabajo no solo fueron estudiadas las poblaciones que residen en la rizosfera de roble melojo sino también aquellos individuos que además se hallaban potencialmente activos. De esta manera se pudo observar que algunos de los taxones menos abundantes como varios de los OTUs pertenecientes a los géneros *Phenylobacterium* y *Pseudomonas* podrían encontrarse metabólicamente activos en un

hábitat como la rizosfera de una quercínea. Una gran parte de las poblaciones bacterianas del suelo se encuentra en dormancia o con un nivel metabólico considerablemente reducido, siendo por tanto mínima su interacción con la planta hospedadora (Lennon y Jones, 2011; Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013). Aunque con el diseño experimental aquí seguido no fue posible conocer el papel ecológico de los mencionados OTUs, los resultados obtenidos suponen un avance en el ámbito de la microbiología de los ecosistemas forestales. La asignación de dichos OTUs como hipotéticos miembros activos del procarioma rizosférico de roble melojo puede considerarse como un criterio de preselección de individuos de presunta relevancia en dicho hábitat y los sitúa por lo tanto en el punto de mira de futuros abordajes que pretendan conocer el papel procariótico en los ecosistemas forestales.

Dos de los géneros de interés por su mencionado potencial y su posible capacidad para tolerar compuestos con actividad antimicrobiana comúnmente presentes en el entorno de las quercíneas (taninos), fueron *Phenylobacterium* y *Pseudomonas*. Lamentablemente no fue posible aislar bacterias pertenecientes al primer género mencionado, si bien se logró obtener una colección de 44 cepas del género *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de *Q. pyrenaica*, las cuales resultaron genotípicamente diversas. Tan solo dos de ellas podrían pertenecer a una especie previamente descrita (*P. lactis*), pudiendo representar la mayoría de las cepas analizadas hasta incluso cinco especies no conocidas hasta la fecha de escritura de esta memoria de Tesis (Capítulo IV). Estos resultados no son absolutamente sorprendentes ya que numerosas nuevas especies aisladas de muestras de origen vegetal e incluso de ecosistemas forestales han sido descritas en los últimos años (Peix *et al.*, 2018). Por otro lado, la taxonomía y la filogenia de las cepas analizadas así como los datos obtenidos mediante pirosecuenciación y secuenciación Illumina demuestran que la rizosfera de roble melojo es un importante nicho ecológico de gran diversidad procariota aún poco explorado, tal y como se ha documentado previamente para otros ecosistemas forestales (Baldrian *et al.*, 2012; Lladó *et al.*, 2016; entre otros).

Beckers y colaboradores (2016) demostraron que las bacterias que habitan la endosfera de individuos de álamo (*Populus tremula* x *Populus alba*) son capaces de responder a cambios fenotípicos en el hospedador, a diferencia de lo observado para bacterias rizosféricas. Así pues, ante la sensibilidad de este tipo de microorganismos, se consideró esencial el estudio de la endosfera radicular de roble melojo para la búsqueda de bacterias que pudieran interaccionar con dicho hospedador. Conforme se expone en el Capítulo IV, se logró aislar 17 cepas pertenecientes al género *Luteibacter* con un posible origen clonal de algunas de ellas.

Tal y como se pudo intuir a partir de los resultados del Capítulo II, a lo largo de los Capítulos V y VI quedó demostrado que diferentes cepas e incluso especies del género *Pseudomonas* tienen un considerable potencial metabólico, al igual que las cepas pertenecientes a la colección de *Luteibacter*.

Considerando el conjunto de cepas del género *Pseudomonas* podría destacarse el potencial funcional del mismo, dado el considerable número de enzimas, pero especialmente de actividades detectadas relacionadas con la estimulación del crecimiento vegetal. La diversidad funcional de este género quedó patente incluso a nivel infraespecífico, ya que varias cepas que exhibieron el mismo perfil RAPD y la

misma secuencia del gen *rpoD* mostraron diferentes habilidades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal *in vitro*.

Dicha variabilidad apreciada a nivel incluso infraespecífico no sería de extrañar dados los diferentes fenotipos que caracterizan a cepas de este género, cuyos genomas son extraordinariamente diversos (Loper *et al.*, 2012). Por otro lado, no resultó sorprendente la variabilidad metabólica de las cepas aisladas de la rizosfera de roble melojo, la cual quedó reflejada en la incapacidad de algunas de ellas de solubilizar solamente uno de los dos tipos de fosfato cálcico estudiados (Capítulo VI), o en cuanto a las diferentes estrategias de utilización de enzimas detectadas (Capítulo V). Uno de los aspectos que caracteriza al género *Pseudomonas* es precisamente su plasticidad metabólica, encontrándose esta vinculada a su capacidad para colonizar multitud de nichos diferentes, entre ellos, la rizosfera de las plantas. Ambas propiedades son habitualmente buscadas para el desarrollo de bioinoculantes exitosos. El marcado repertorio de actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal mostrado por muchas de las cepas del género *Pseudomonas* aquí estudiadas, hace que estas sean firmes candidatas para su inclusión en la formulación de bioinoculantes. No solo por su posible contribución a la nutrición y desarrollo vegetal, sino también por su diversa posible contribución a los ciclos biogeoquímicos.

En el caso de la colección de cepas correspondientes al género *Luteibacter*, pudo observarse una considerable homogeneidad en cuanto a sus capacidades enzimáticas y promotoras del crecimiento vegetal, probablemente debido al origen clonal de las mismas. Sin embargo, su habilidad para producir un gran número de enzimas implicados en la degradación de diferentes sustratos de origen vegetal y fúngico, así como la asociación mayoritaria de los enzimas a la pared celular bacteriana hace pensar que dichas cepas podrían ser buenas colonizadoras y competidoras en el nicho radicular, sugiriendo al mismo tiempo su capacidad para acceder al interior de la raíz de las plantas (Menéndez *et al.*, 2015). Dicha propiedad sería de gran interés de cara al desarrollo de posibles bioinoculantes ya que tanto la interacción con el hospedador de las bacterias incluidas en las bioformulaciones como el establecimiento de las mismas en el nicho donde sea que ejerzan su función son dos atributos fundamentales para que dichos productos biológicos tengan éxito (Kaminsky *et al.*, 2019). Sin embargo, la hipotética capacidad colonizadora y competidora de las 17 cepas del género *Luteibacter* debería ser testada en estudios futuros para confirmar sus prometedoras capacidades.

Por otro lado, el potencial promotor del crecimiento de las plantas hace que estas cepas sean candidatas para su uso como bioinoculantes. Debe remarcarse que debido posiblemente a la relativamente reciente descripción del género *Luteibacter* (Johansen *et al.*, 2005), la información disponible en la literatura científica sobre su metabolismo y fisiología es aún escasa. Así pues, ello dificultó el estudio de ciertas propiedades metabólicas como la capacidad de emplear ACC como única fuente de N, siendo por tanto incompleta la descripción de las capacidades metabólicas de las cepas adscritas a este género. En definitiva, la caracterización metabólica y fisiológica detallada de las mismas es una de las nuevas vías de investigación que abre la presente Tesis Doctoral, considerándose de gran relevancia el ahondar en aspectos como los requerimientos

nutricionales de estas cepas para poder obtener beneficio en un futuro del presumible potencial de las mismas.

Algunos autores defienden que la diversidad genotípica puede influir en el éxito a largo plazo de las comunidades microbianas para amortiguar cambios extremos en el ecosistema (Cordero y Polz, 2014). Además, es bien sabido que el papel que estas desempeñan en entornos como los bosques es esencial y determinante para la sostenibilidad de los mismos, por lo que los diferentes niveles de diversidad genotípica y metabólica observados para las cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Luteibacter* podrían ser síntoma de su relevancia en el mantenimiento del equilibrio de un nicho como la raíz de roble melojo. Además, teniendo en cuenta las aportaciones de Cordero y Polz (2014), la diversidad genotípica y especialmente la funcional y metabólica (Capítulos V y VI) sugiere que nos encontramos ante bacterias con gran potencial para mitigar o suavizar los efectos del cambio global sobre roble melojo y contribuir positivamente su *fitness*.

De forma paralela, y tomando en consideración los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo y los conocimientos científicos preexistentes, se considera apropiada la realización de tareas de repoblación en el Espacio Natural de Sierra Nevada con plantones de roble melojo tratados en vivero con un inoculante bacteriano. Por un lado, es sabido que las repoblaciones forestales traen asociados ciertos beneficios ecosistémicos, contribuyendo al secuestro de C atmosférico, la preservación del agua y del suelo, y neutralizando el pH edáfico (Hong *et al.*, 2018). Sin embargo, tal y como se ha mencionado, una de las situaciones críticas del proceso de repoblación se alcanza cuando los plantones son transferidos de vivero a campo, pasando de un entorno absolutamente favorable para su desarrollo a las duras condiciones naturales que se dan por ejemplo en verano en la zona mediterránea. Algunos autores proponen el uso de la tecnología de BCAs y especialmente PGPB para generar vigorosidad en las especies leñosas, y por ende, mejorar la supervivencia de los plantones en campo tras los trasplantes (Lucas García *et al.*, 2004). En el presente caso, la ausencia de diferencias en la riqueza, equidad, composición, estructura y funcionalidad predicha de las comunidades procariotas habitantes en la rizosfera de plantones de roble melojo inoculados respecto a aquellos no inoculados, permitió sentar los cimientos del desarrollo de bioinoculantes al no suponer la inoculación (tras 18 meses) una alteración ecológica en un Espacio Protegido (Capítulo III). Aunque en primera instancia pudo superarse la barrera que supondría una alteración ecológica asociada a la inoculación, la siguiente limitación que habitualmente puede comprometer el desarrollo de bioinoculantes es la elección de los candidatos bacterianos a incluir en la bioformulación (Kaminsky *et al.*, 2019). Esta depende del objetivo perseguido, pudiendo buscarse desde productos con los que se desee tan solo mejorar la nutrición y/o el desarrollo vegetal, la protección frente a organismos fitopatógenos, ambos, o incluso la adicional contribución a los procesos ecosistémicos. Dado que el presente trabajo de investigación constituye un estudio preliminar sobre las capacidades funcionales de las cepas aisladas, la selección de los mejores candidatos sería dificultosa. Si bien algunas cepas como *Pseudomonas* sp. p49, L7 y L10 (género *Luteibacter*) fueron de las más prometedoras por la riqueza de enzimas hidrolíticos producidos, sus rasgos promotores del crecimiento vegetal y su tolerancia a elevadas concentraciones de ácido tánico en el primer caso, tan solo el efecto beneficioso de la cepa L7 pudo ser confirmado sobre

plantas de *M. sativa*. Por otro lado, el posible antagonismo de las cepas *Pseudomonas* sp. p2 y p53 frente a los hongos fitopatógenos estudiados no pudo ser evaluado *in planta*, quedando por tanto comprometida la selección de los mejores candidatos en base a dichas propiedades. En suma, el desarrollo de un bioinoculante basado en las cepas en estudio todavía requeriría la realización de diferentes ensayos hasta el perfeccionamiento del mismo. Dada la ausencia de cepas que muestren todo el rango de propiedades (directas e indirectas) relacionadas con el mejor desarrollo vegetal así como los 12 enzimas hidrolíticos estudiados, se propone el desarrollo de un consorcio bacteriano con el que cubrir todo el rango de atributos mencionados, habiendo previamente estudiado su eficiencia *in planta*. Por otro lado, otro aspecto a valorar de gran relevancia en el ámbito de las repoblaciones forestales es el área montañosa donde llevar a cabo la repoblación y la estrategia a seguir. A tenor de los resultados preliminares de supervivencia de los plantones trasplantados (Capítulo III) y considerando las evidencias científicas preexistentes que demuestran el efecto protector de las plantas facilitadoras (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004), se propone la realización de tareas de repoblación con plantones de roble melojo inoculados, en combinación con o bajo plantas nodrizas que los protejan de las altas temperaturas, baja humedad ambiental y alta radiación solar típicas en algunas zonas del Espacio Natural de Sierra Nevada. A su vez, considerando las preferencias edáficas y climáticas de *Q. pyrenaica*, se considera oportuno la repoblación en áreas húmedas y sombrías, siendo un claro ejemplo aquellas que antaño se encontraron cubiertas por densos melojares que fueron reemplazados por masas de pino silvestre (*P. sylvestris*) (Bonet *et al.*, 2015), como NPF.

En otro orden de cosas, los resultados obtenidos en esta Tesis revelaron la gran diversidad bacteriana que alberga el suelo – especialmente aquel bajo la influencia de las raíces de diversas especies vegetales – del Espacio Natural de Sierra Nevada. Si bien este enclave es conocido por la riqueza y diversidad de su flora (Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, 2019), el presente trabajo en su conjunto demuestra que las bacterias que viven en asociación con las raíces de plantas leguminosas e incluso de la leñosa *Q. pyrenaica* son también un claro ejemplo de variabilidad y riqueza biológica. En un escenario tal, la diversidad bacteriana fue puesta de manifiesto a varios niveles. Desde el punto de vista del genotipo de las bacterias aisladas, los numerosos perfiles RAPD tanto en el caso de los rizobios como en el de la colección de cepas del género *Pseudomonas* reflejaron la variabilidad de las mismas. Por otro lado, los genes *housekeeping* *recA*, *atpD*, *glnII* y *rpoD*, así como el gen de nodulación *nodC* correspondiente a los rizobios resultaron también considerablemente polimórficos, lo cual quedó patente en el elevado número de tipos y variantes diferentes de dichos genes observados para los rizobios y las cepas adscritas al género *Pseudomonas*. Debe destacarse que incluso la secuencia del gen *rrs* puede considerarse diversa en el caso de los rizobios pese a detectarse únicamente tres tipos distintos, dada la frecuente absoluta identidad de la misma en cepas adscritas al género *Rhizobium*. En cualquier caso, la diversidad génica se tradujo en una notable diversidad taxonómica, reflejada en el aislamiento de cepas pertenecientes a diferentes especies del género *Rhizobium*, y hasta seis especies del género *Pseudomonas*, cinco de ellas no conocidas hasta la fecha y por ende posible nuevas especies. En lo referente a los procesos ecológicos en los que cepas aisladas de la rizofera y endosfera radicular participan, debe remarcarse la gran variedad de enzimas implicados en la degradación

Discusión general

de la materia orgánica producidos por las cepas adscritas al género *Luteibacter*. Así, estas fueron en su mayoría capaces de producir un número elevado de enzimas, denotando por tanto la riqueza funcional de las mismas. La coexistencia de múltiples cepas que podrían llevar a cabo las mismas funciones ecológicas sugirió a su vez la existencia de una considerable redundancia funcional de la colección de cepas del género *Luteibacter* en lo que a la degradación de la materia orgánica se refiere. Sin embargo, debe destacarse que el origen clonal de dichas cepas podría ser causa de la duplicidad enzimática observada, residiendo su verdadero potencial en la cantidad de sustratos diferentes sobre los que podría actuar cada una de ellas. Por otro lado, en el caso de la colección del género *Pseudomonas*, es de mencionar que pudo detectarse cierta variabilidad en cuanto al número de enzimas producidos por algunas cepas y a los perfiles enzimáticos de las mismas, observándose en determinados casos cierta duplicidad en ambos aspectos.

La riqueza, versatilidad y redundancia funcional de ambas colecciones bacterianas pudo ser igualmente observada en cuanto a las actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal (directas e indirectas), siendo ambos aspectos más marcados en el caso de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Por otro lado, cabe destacar que a nivel fisiológico o en términos de la localización de los enzimas extracelulares activos, también se apreció cierta diversidad. Mientras la actividad de los enzimas fue principalmente detectada en la fracción asociada a las células en el caso de las cepas adscritas al género *Luteibacter* y para la mayoría de los enzimas, aquellas pertenecientes a la colección de *Pseudomonas* mostraron cierta variabilidad en la estrategia de utilización de los mismos, observándose diferentes patrones en función de las cepas y enzimas en estudio.

La diversidad no sólo fue notoria en el caso de las bacterias aisladas del exterior de la raíz de las plantas leguminosas y la leñosa en estudio. A nivel poblacional, fue posible registrar secuencias del gen *rrs* correspondientes a un elevado número de OTUs diferentes en la rizosfera de roble melojo, siendo la riqueza esperada de dichas comunidades también muy elevada. Igualmente, la ausencia de dominancia de OTUs concretos – o lo que es lo mismo, la equidad de las comunidades – fue también considerable. Igualmente fue remarcable la diversidad taxonómica de las poblaciones en su conjunto. A su vez, el elevado porcentaje de secuencias parciales del gen *rrs* que no pudieron ser clasificadas en un taxón conocido o descrito en la base de datos de secuencias empleada pone de manifiesto la inmensa diversidad de dichas comunidades. Este hecho se encuentra en línea con la presunción generalizada de que en la actualidad tan solo se conoce un porcentaje muy bajo de todos los microorganismos que habitan los ecosistemas naturales, así como con el trabajo de Delgado-Baquerizo (2019) en el que se destacan los bosques templados como unos de los que albergan mayor porcentaje de *phyla* no identificados en sus suelos. Así pues, se podría considerar la rizosfera de *Q. pyrenaica* como una importante fuente de taxones aún no conocidos. Debe remarcarse que las numerosas evidencias de diversidad bacteriana fueron obtenidas para todas las condiciones analizadas: tanto en el caso de las comunidades procariotas de robles de diferentes edades y tipo de formaciones boscosas (Capítulo II), así como para robles trasplantados procedentes de vivero (inoculados y sin inocular, Capítulo III), localizados todos ellos en el seno del Espacio Natural de Sierra Nevada.

Habitualmente se considera que la redundancia funcional en un ecosistema se encuentra vinculada a la estabilidad del mismo frente a perturbaciones (Allison y Martiny, 2008), y que es frecuente encontrar cierta redundancia en muchos sistemas microbianos (Louca *et al.*, 2018). Por otro lado, la diversidad microbiana se encuentra positivamente correlacionada con la multifuncionalidad de los ecosistemas terrestres a escala global, influyendo fuertemente en procesos ecológicos clave (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016). Igualmente, también ha sido sugerida la diversidad de las comunidades como pieza clave de la menor susceptibilidad a las invasiones producidas por otros organismos (Mallon *et al.*, 2015). Así pues, teniendo en cuenta todas las evidencias obtenidas a lo largo de esta Tesis, puede concluirse que las comunidades procariotas asociadas a las raíces de plantas leguminosas y de la leñosa *Q. pyrenaica* son notablemente diversas a varios niveles, sugiriendo por tanto que frente a posibles alteraciones como las que acompañan al cambio global, estas podrían contribuir a la resiliencia del ecosistema en estudio. A su vez, las colecciones de cepas aisladas del entorno radicular de *Q. pyrenaica* mostraron potencial para participar en los ciclos del C, P y N, cobrando especial interés en el mantenimiento de la funcionalidad del ecosistema estudiado dada la relevancia del cierre de los ciclos biogeoquímicos en los bosques (Lladó *et al.*, 2017). Por otro lado, los resultados obtenidos indican que el Espacio Natural de Sierra Nevada es un importante punto caliente de diversidad procariota. Así pues, se propone este enclave y los holobiontes estudiados como importante reservorio para el aislamiento de bacterias con potencial metabólico, especialmente en el ámbito de la tecnología de los bioinoculantes.



CONCLUSIONS

La imagen muestra un plantón de *Quercus pyrenaica* ubicado en la zona de muestreo NPF.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

1. The forage legume plants *Lathyrus cicera*, *L. intricatus*, *Vicia sativa* subsp. *angustifolia*, *V. disperma*, *Trifolium glomeratum* and *T. cherleri* are nodulated by genotypically diverse strains belonging to the *Rhizobium leguminosarum* phylogenetic group. Some strains could be novel species of this genus, although they correspond to the already described symbiovars *viciae* and *trifolii*.
2. The taxonomic status of genus *Rhizobium* should undergo a profound revision due to the high amount of strains that were grouped in different clusters and belonged to different phylogenetic lineages depending on the considered gene.
3. The rhizospheric core procariome of *Quercus pyrenaica* trees of different ages is dominated by a relatively small number of OTUs which are highly abundant.
4. By analyzing just the DNA based-metabarcoding data some taxa could be ignored due to their scarce relative abundance. However, the combination of DNA and RNA-derived metabarcoding techniques suggested that some rare taxa inhabiting the rhizosphere of *Q. pyrenaica* could be potentially active.
5. Inoculation of melojo oak plantlets with a bacterial consortium does not entail an alteration of the richness, evenness, structure, composition and potential functionality of melojo oak rhizospheric prokaryotic communities with respect to non-inoculated plantlets, two years after the bacterial treatment. Therefore, the transplantation of bacterially-inoculated plantlets from nursery to field conditions seems to be an ecologically safe strategy.
6. Strains belonging to genus *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of *Q. pyrenaica* are genotypically diverse and all of them belong to the *P. fluorescens* lineage; most of them could represent putatively up to five novel species. On the other hand, most of the 17 strains isolated from melojo oak's root endosphere may have clonal origin and all of them were related to *Luteibacter rhizovicius*.
7. Many of the studied bacteria associated to melojo oak roots had the potential to improve, directly or indirectly, plant host's fitness through different enzymatic and metabolic mechanisms.
8. Bacterial cell wall-associated enzymes accounted for a noteworthy proportion of the total enzymatic activity, especially in the case of *Luteibacter* strains isolated from the root endosphere of *Q. pyrenaica*. However, the enzyme deployment strategy of those rhizospheric *Pseudomonas* strains was diverse.
9. According to the activity of both cell-bound and diffusible extracellular enzymes, *Luteibacter* strains are potential plant and fungal biomass degraders, whereas the potential contribution of *Pseudomonas* strains to organic matter decomposition processes seems moderate. In both cases, root associated bacteria could be involved in C, N and P cycling.
10. The Natural and National Park of Sierra Nevada is an important hotspot of bacterial diversity at genetic, genotypic, functional, physiological and taxonomic level.

A low-angle photograph of a forest. The image shows the trunks of several trees reaching upwards towards a canopy of green leaves. Sunlight is filtering through the leaves, creating a dappled light effect. The overall tone is natural and serene.

BIBLIOGRAFÍA

La imagen muestra un bosque mixto de *Quercus* sp. y otras especies en el Parque Natural de Peñas de Aia (Gipuzkoa)

Fuente: Ana V. Lasa.

- Aarab, S., El Habil-Addas, F., Laglaoui, A., Bakkali, M. y Arakrak, A. (2015) Solubilization of inorganic phosphate by *Pseudomonas* strains isolated from rice rhizosphere. *International Journal of Biosciences*;6:116-124.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. y Salveit Jr., M.E. (1992) *Ethylene in Plant Biology*. (2ª ed.) New York Academic Press.
- Acinas, S.G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V. y Polz, M.F. (2005) PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. *Applied and Environmental Microbiology*;71:8966-8969.
- Aerts, R. y Honnay, O. (2011) Forest restoration, biodiversity and ecosystem functioning. *BMC Ecology*;11:29. doi: 10.1186/1472-6785-11-29
- Agaras, B.C., Scandiani, M., Luque, A., Fernández, L., Farina, F., Carmona, M. et al. (2015) Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. *Biological Control*;90:173-186.
- Ahemad, M. y Kibret, M. (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*;26:1-20.
- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Bååth, E. y Domínguez, J. (2010) Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*;42:2276-2281.
- Akter, S. y Huq, M.A. (2018) *Luteibacter pinisoli* sp. nov., a casein degrading bacterium isolated from rhizospheric soil of *Pinus koraiensis*. *Archives of Microbiology*;200:1017-1023.
- Alexander, D.B. y Zuberer, D.A. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*;12:39-45.
- Alía-Miranda, R., García del Barrio, J.M., Iglesias Sauce, S., Mancha Nuñez, J.A., de Miguel y del Ángel, J., Nicolás Peragón, J.L. et al. (2009). *Regiones de procedencia de especies forestales en España*. Madrid: Organismo Autónomo Parques Nacionales.
- Allison, S.D. (2005) Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. *Ecology Letters*;8:626-635.
- Allison, S.D. y Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;05:11512-11519.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*;215:403-410.
- Álvarez-Martínez, E.R., Valverde, A., Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P.F. et al. (2009) The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic

Bibliografía

origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. Archives of Microbiology;191:659-668.

Amarger, N., Macheret, V. y Laguerre, G. (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of Systematic Bacteriology;47:996-1006.

Anand, R. y Chanway, C. (2013a) N₂-fixation and growth promotion in cedar colonized by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa*. Biology and Fertility of Soil;49:235-239.

Anand, R., Grayston, S. y Chanway, C. (2013b) N₂-Fixation and Seedling Growth Promotion of Lodgepole Pine by Endophytic *Paenibacillus polymyxa*. Microbial Ecology;66:369-374.

Anderson, M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecology;26:32-46.

Anderson, M.J. (2006) Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersion. Biometrics;62:245-253.

Anderson, M.J. y Walsh, D.C.I. (2013) PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing?. Ecological Monographs;83:557-574.

Anderson, M.J. y Willis, T.J. (2003) Canonical Analysis of Principal Coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. Ecology;84:511-525.

Andrews, S. (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [Consultado: 11-11-2017].

Anwar, N., Abaydulla, G., Zayadan, B., Abdurahman, M., Hamood, B., Erkin, R. et al. (2016) *Pseudomonas populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;66:1419-1425.

Anwar, N., Rozahon, M., Zayadan, B., Mamtimin, H., Abdurahman, M., Kurban, M. et al. (2017) *Pseudomonas tarimensis* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from *Populus euphratica*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;67:4372-4378.

Aoki, S., Kondo, T., Prévost, D., Nakata, S., Kajita, T. y Ito, M. (2010) Genotypic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Lathyrus japonicus* indigenous to Japan. Systematic and Applied Microbiology;33:383-397.

Araújo, G.C., Sousa, N.R., Ramos, M.A., Vega, A.L. y Castro, P.M.L. (2018) Performance of *Quercus suber* L. at nursery stage—application of two bio-inoculants under two distinct environments. Annals of Forest Science;751:29 doi: 10.1007/s13595-018-0700-3

- Aslantaş, R., Çakmakçı, R. y Şahin, F. (2007) Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulturae*;111:371-377.
- Aspizua, R., Barea-Azcón, J.M., Bonet, F.J., Pérez-Luque, A.J. y Zamora, R. (2012) Observatorio de Cambio Global Sierra Nevada: metodologías de seguimiento. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente.
- Auer, L., Mariadassou, M., O'Donohue, M., Klopp, C. y Hernandez-Raquet, G. (2017) Analysis of large 16S rRNA Illumina data sets: Impact of singleton read filtering on microbial community description. *Molecular Ecology Resources*;17:e22-132.
- Auguie, B. (2017) gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics. R package version 2.3. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>
- Augusto, L., Bonnaud, P. y Ranger, J. (1998) Impact of tree species on forest soil acidification. *Forest Ecology and Management*;105:67-78.
- Baker, G.C., Smith, J.J. y Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*;55:541-555.
- Baldrian, P. (2009) Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environment*;55:370-378.
- Baldrian, P. (2016) Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*;41:109-130.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T. *et al.* (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME Journal*;6:248-258.
- Baldrian, P., Větrovský, T., Cajthaml, T., Dobiášová, P., Petránková, M., Šnajder, J. *et al.* (2013) Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. *Fungal Ecology*;6:1-11.
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L. y Valášková, V. (2011) Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil*;338:111-125.
- Baltrus, D.A., Clark, M., Inderbitzin, P., Pignatta, D., Knight-Connoni, V. y Arnold, A.E. (2019) Complete Genome Sequence of *Luteibacter pinisoli* MAH-14. *Microbiology Resource Announcements*;8:e00774-19. doi: 10.1128/MRA.00774-19
- Balzer, S., Malde, K. y Jonassen, I. (2011) Systematic exploration of error sources in pyrosequencing flowgram data. *Bioinformatics*;27:304-309.
- Bandounas, L., Wierckx, N.J.P., de Winde, J.H. y Ruijsenaars, H.J. (2011) Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnology*;11:94. doi: 10.1186/1472-6750-11-4
- Barriuso, J., Ramos Solano, B., Santamaría, C., Daza, A. y Gutiérrez Mañero, F.J. (2008) Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated

Bibliografía

Pinus spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*;105:1298-1309.

Bartnicki-Garcia, S. (1966) Chemistry of Hyphal Walls of *Phytophthora*. *Journal of General Microbiology*;42:57-69.

Bartnicki-Garcia, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*;22:87-108.

Basaraba, J. (1966) Effects of vegetable tannins on glucose oxidation by various microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*;12:787-794.

Basnayake, W.V.S. y Birch, R.G. (1995) A gene from *Alcaligenes denitrificans* that confers albicidin resistance by reversible antibiotic binding. *Microbiology*;141:551-560.

Bastida, F., Torres, I.F., Andrés-Abellán, M., Baldrian, P., López-Mondéjar, R., Větrovský, T. *et al.* (2017) Differential sensitivity of total and active soil microbial communities to drought and forest management. *Global Change Biology*;23:4185-4203.

Bastida, F., Torres, I.F., Moreno, J.L., Baldrian, P., Ondoño, S., Rulz-Navarro, A. *et al.* (2016) The active microbial diversity drives ecosystem multifunctionality and is physiologically related to carbon availability in Mediterranean semi-arid soils. *Molecular Ecology*;25:4660-4673.

Bates, R.G. (1983) Determination of pH: theory and practice. New York: Wiley.

Batjes, N.H. (1996) Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science*;47:151-163.

Baumgartner, K. y Warncok, A.E. (2006) A Soil Inoculant Inhibits *Armillaria mellea* *In Vitro* and Improves Productivity of Grapevines with Root Disease. *Plant Disease*;90:439-444.

Beckers, B., De Beeck, M.O., Weyens, N., Boerjan, W. y Vangronsveld, J. (2017) Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome*;5:25. doi: 10.1186/s40168-017-0241-2

Beckers, B., De Beeck, M.O., Weyens, N., Van Acker, R., Van Montagu, M., Boerjan, W. *et al.* (2016) Lignin engineering in field-grown poplar trees affects the endosphere bacterial microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;113:2312-2317.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. y Hoonda, I G. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*;56:326-338.

Beier, S. y Bertilsson, S. (2013) Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*;4:149. doi: 10.3389/fmicb.2013.00149

Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E. *et al.* (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria

isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*;47:242–252.

Benizri, E., Baudoin, E. y Guckert, A. (2001) Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*;11:557-574.

Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Statistical Methodology)*;57:289-300.

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. y Sayers, E.W. (2013) GenBank. *Nucleic Acids Research*;41:D36-D42.

Berg, G., Köber, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R. y Smalla, K. (2017) Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*;93:fix050. doi: 10.1093/femsec/fix050

Bergkemper, F., Kublik, S., Lang, F., Krüger, J., Vestergaard, G., Schloter, M. *et al.* (2016) Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. *Journal of Microbiology Methods*;125:91-97.

Beringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*;84:128-163.

Berlemont, R. y Martiny, A.C. (2013) Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*;79:1545-1554.

Besemer, K., Peter, H., Logue, J.B., Langenheder, S., Lindström, E.S., Tranvik, L.J. *et al.* (2012) Unraveling assembly of stream biofilm communities. *The ISME Journal*;6:1459-1468.

Bhat, T.K., Singh, B. y Sharma, O.P. (1998) Microbial degradation of tannins-A current perspective. *Biodegradation*;9:343-357.

Bhattacharyya, P.N. y Jha, D.K. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*;28:1327-1350.

Blagodatskaya, E. y Kuzyakov, T. (2013) Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*;67:192-211.

Blanco, C. E., Casado, M.A., Costa Tenorio, M., Escribano, R., García Antón, M., Génova, M. *et al.* (1997) Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Barcelona: Planeta.

Blazewicz, S.J., Barnard, R.L., Daly, R.A. y Firestone, M.K. (2013) Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitation and uses. *The ISME Journal*;7:2061-2068.

Blom, D., Fabbri, C., Connor, E.C., Schiestl, F.P., Klauser, D.R., Boller, T. *et al.* (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere

Bibliografía

bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*;13:3047-3058.

Blumer, C. y Haas, D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*;173:170-177.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R. *et al.* (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*;10:57-59.

Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijfjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Ching-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J. *et al.* (2003) Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;16:983-993.

Bonet, F.J., Pérez-Luque, A.J., Aspizua, R., Muñoz, J.M. y Zamora, R. (2015) Impactos del cambio global en los robledales de Sierra Nevada: algunas evidencias y recomendaciones de manejo. En: Zamora, R., Pérez-Luque, A.J., Bonet, F.J., Barea-Azcón, J.M. y Aspizua, R. (Eds.) La huella del cambio global en Sierra Nevada: Retos para la conservación. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.

Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M.S., Nelson, J., Hodgkinson, B.P., Tuskan, G. *et al.* (2014) Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*;23:3356-3370.

Borie, F. y Barea, J.M. (1981) Ciclo del fosforo. I. Formas del elemento en el suelo y su disponibilidad para plantas y microorganismos. *Annales de Edafología y Agrobiología*;40:2351-2364.

Bouyoucos, G.J. (1962) Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analysis of Soils. *Agronomy Journal*;54:464-465.

Bowsher, A.W., Kearns, P.J. y Shade, A. (2019) 16S rRNA/rRNA Gene Ratios and Cell Activity Staining Reveal in Plant-Associated Soil. *Microbial Systems*;4:e00003-19. doi: 10.1128/mSystems.00003-19

Brabcová, V., Nováková, M., Davidová, A. y Baldrian, P. (2016) Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *The New Phytologist*;210:1369-1381.

Brabcová, V., Štursová, M. y Baldrian P. (2018) Nutrient content affects the turnover of fungal biomass in forest topsoil and the composition of associated microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*;118:187-198.

Bray, R.H. y Kurtz, L.T. (1945) Determination of total, organic and available form of phosphorus in soil. *Soil Science*;59:39-46.

Bremner, J.M. (1965) Inorganic forms of nitrogen. En: Black, C.A. *Methods of Soil Analysis*. Madison: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.

- Bresciani, F.R., Santi, L., Macedo, A.J., Abraham, W.R., Vainstein, M.H. y Beys-da-Silva, W.O. (2014) Production and activity of extracellular lipase from *Luteibacter* sp. *Annals of Microbiology*;64:251-258.
- Broadbent, P., Baker, K.F. y Waterworth, Y. (1971) Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biological Sciences*;24:925-944.
- Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Appel, D.N. y Filter, T.H. (1994) Evaluation of Endophytic Bacteria as Potential Biological Control Agents for Oak Wilt. *Biological Control*;4:373-381.
- Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M.A., Yang, W. *et al.* (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*;433:629-633.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Munch, P.C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y. *et al.* (2015) Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host and Microbe*;17:392-403.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L. y Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*;64:807-838.
- Burns, R.G. (1982) Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*;14:423-427.
- Burns, R.G. (2010) How Do Microbial Extracellular Enzymes Locate and Degrade Natural and Synthetic Polymers in Soil. En: Xu, J. y Huang, P.M. (Eds.) *Molecular Environmental Soil Science at the Interfaces in the Earth's Critical zone*. Hangzhou: Springer.
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D. *et al.* (2013) Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*;58:216-234.
- Busby, P.E., Soman, C., Wagner, M.R., Friesen, M.L., Kremer, J., Bennett, A. *et al.* (2017) Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS Biology*;15:e2001793. doi: 10.1371/journal.pbio.2001793
- Busquets, A., Gomila, M., Beiki, F., Mulet, M., Rahimian, H., García-Valdés, E. *et al.* (2017) *Pseudomonas caspiana* sp. nov., a citrus pathogen in the *Pseudomonas syringae* phylogenetic group. *Systematic and Applied Microbiology*;40:266-273.
- Calvaruso, C., Turpault, M.P., Leclerc, E. y Frey-Klett, P. (2007) Impact of Ectomycorrhizosphere on the Functional Diversity of Soil Bacterial and Fungal Communities from a Forest Stand in Relation to Nutrient Mobilization Processes. *Microbial Ecology*;54:567-577.
- Campanile, G., Ruscelli, A. y Luisi, N. (2007) Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. *European Journal of Plant Pathology*;117:237-246.

Bibliografía

Campbell, B.J., Yu, L., Heidelberg, J.F. y Kirchman, D.L. (2011) Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;108:12276-12781.

Carrillo-Castañeda, G., Juárez-Muños, J., Peralta-Videa, J.R., Gomez, E., Tiemann, K.J., Duarte-Gadea, M. *et al.* (2002) Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*;6:391-399.

Carrim, A.J.I., Barbosa, E.C. y Vieira, J.D.G. (2006) Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*;49:353-359.

Castillo Marín, P.A. y Castillo Marín, A. (2010) Situación y caracterización del roble melojo (*Quercus pyrenaica* Willd.) en el parque natural de la Sierra de Aracena y Picos de Aroche (Huelva). *Foresta*;50:92-100.

Castro, R.A., Quecine, M.C., Lacava, P.T., Batista, B.D., Luvizotto, D.M., Marcon, J. *et al.* (2014) Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*;3:382. doi: 10.1186/2193-1801-3-382.

Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y. y Jurkevitch, E. (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*;276:1-11.

Cazorla, F.M., Duckett, S.B., Bergström, E.T., Noreen, S., Odijk, R., Lugtenberg, B.J.J. *et al.* (2006) Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 Correlates With the Production of 2-Hexyl 5-Propyl Resorcinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;19:418-428.

Cessna, S.G., Sears, V. E. y Low, P.S. (2000) Oxalic acid, a pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. *The Plant Cell*;12:2191-2199.

Chanway, C.P. (1997) Inoculation of Tree Roots with Plant Growth Promoting Soil Bacteria: An Emerging Technology for Reforestation. *Forest Science*;43:99-112.

Chanway, C.P. y Holl, F.B. (1991) Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. *Canadian Journal of Botany*;69:507-511.

Chao, A. (1984) Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*;4:265-270.

Charco, J. (2002) La regeneración natural del bosque mediterráneo en la Península Ibérica. Madrid: Asociación para la Recuperación el Bosque Autóctono.

Chatterjee, S., Hadi, A.S. y Price, B. (2000) Regression Analysis by Examples. New York: Wiley.

Chen Z.Y., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J. *et al.* (2007) *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin

physiology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;104:20131-20136.

Chenn, H. y Boutros, P.C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. BMC Bioinformatics;12:35. doi: 10.1186/1471-2105-12-35.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C. y Lugtenberg, B.J. (2000) Root Colonization by Phenazine-1-Carboxamide-Producing Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is Essential for Biocontrol of Tomato Foot and Root Rot. Molecular Plant-Microbe Interaction;13:1340-1345.

Chowdhury, S.P., Khanna, S., Verma, S.C. y Tripathi, A.K. (2004) Molecular diversity of tannic acid degrading bacteria isolated from tannery soil. Journal of Applied Microbiology;97:1210-1219.

Ciccillo, F., Fiore, A., Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S. y Chiarini, L. (2002) Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. Environmental Microbiology;4:238-245.

Clarke, K.R. y Ainsworth, M. (1993) A method of linking multivariate community structure to environmental variables. Marine Ecology Progress Series;92:205-219.

Cobo-Díaz, J.F., Fernández-González, A.J., Villadas, P.J., Robles, A.B., Toro, N. y Fernández-López, M. (2015). Metagenomic Assessment of the Potential Microbial Nitrogen Pathways in the Rhizosphere of a Mediterranean Forest After a Wildfire. Microbial Ecology;69:895-904.

Cobo-Díaz, J.F., Fernández-González, A.J., Villadas, P.J., Toro, N., Tringe, S.G. y Fernández-López, M. (2017) Taxonomic and Functional Diversity of a *Quercus pyrenaica* Willd. Rhizospheric Microbiome in the Mediterranean Mountains. Forests;8:390. doi: 10.3390/f8100390

Cobo-Díaz, J.F., Martínez-Hidalgo, P., Fernández-González, A.J., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E. *et al.* (2014) The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar (sierranevadense). Systematic and Applied Microbiology;37:177-185.

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y. *et al.* (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research;42:633-642.

Coleman-Derr, D., Desgarennés, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T. *et al.* (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. The New Phytologist;209:798-811.

Corcobado, T., Solla, A., Madeira, M.A. y Moreno, G. (2013) Combined effects of soil properties and *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus ilex* decline. Plant and Soil;373:403-413.

Bibliografía

- Cordero, O.X. y Polz, M.F. (2014) Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nature Reviews. Microbiology*;12:263-273.
- Coyotzi, S., Pratscher, J., Murrel, J.C. y Neufeld, J.D. (2016) Targeted metagenomics of active microbial populations with stable-isotope probing. *Current Opinion Biotechnology*;41:1-8.
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W.K. *et al.* (2016) The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*;7:1008-1018.
- Crowther, T.W., Glick, H.B., Covey, K.R., Bettigole, C., Maynard, D.S., Thomas, S.M. *et al.* (2015) Mapping tree density at a global scale. *Nature*;525:201-205.
- Crowther, T.W., Maynard, D.S., Leff, J.W., Olfeld, E.E., McCulley, R.L., Fierer, N. *et al.* (2014) Predicting the responsiveness of soil biodiversity to deforestation: a cross-biome study. *Global Change Biology*;20:2983-2994.
- Cui, L., Wu, S.Q., Zhao, C.A. y Tin, C.R. (2016) Microbial conversion of major ginsenosides in ginseng total saponins of *Platycodon grandiflorum* endophytes. *Journal of Ginseng Research*;40:366-374.
- Dangeard, P.A. (1926) *Recherches sur les tubercules radicaux des Légumineuses*. París: Ed. Du Botaniste.
- Daur, I., Saad, M.M., Eida, A.A., Ahmad, S., Shah, Z.H., Ihsan, M.Z. *et al.* (2018) Boosting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Production With Rhizobacteria From Various Plants in Saudi Arabia. *Frontiers in Microbiology*;9:477. doi: 10.3389/fmicb.2018.00477
- Dawid, W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*;24:403-427.
- de Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C. y Boddy, L. (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*;29:795-811.
- de Boer, W., Wagenaar, A.M., Gunnewiek, P.J.A. y van Venen, J.A. (2007) *In vitro* suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*;59:177-185.
- de Mendiburu, F. (2017) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-8. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- DeAngelis, K.M. y Firestone, M.K. (2012) Phylogenetic Clustering of Soil Microbial Communities by 16S rRNA but Not 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*;78:2459-2461.
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Rouseel, A., Altermatt, F. *et al.* (2016) Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*;26:5872-5895.

Delgado-Baquerizo, M. (2019) Obscure soil microbes and where to find them. *The ISME Journal*;13:2120-2124.

Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D. *et al.* (2016) Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*;7:10541. doi: 10.1038/ncomms10541

Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A.M., Brewer, T.E., Benavent-González, A., Eldridge, D.J., Bardgett, R.D. *et al.* (2018) A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*;359:320-325.

Dell'Amico, E., Cavalca, L. y Andreoni, V. (2008) Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Chemistry*;40:74-84.

Deschamps, A.M. (1989) Microbial degradation of tannins and related compounds. En: Lewis, N.G. y Paice, M.G. (Eds.) *Plant Cell Wall Polymers Biogenesis and Biodegradation*. Washington DC: American Chemical Society.

Díaz-Alcántara, C.A., Ramírez-Bahena, M.H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A. *et al.* (2014) Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Systematic and Applied Microbiology*;37:149-156.

Dikin, A., Sijam, K., Kadir, J. y Seman, I.A. (2007) Mode of Action of Antimicrobial Substances from *Burkholderia multivorans* and *Microbacterium testaceum* against *Schizophyllum commune* Fr. *International Journal of Agriculture and Biology*;9:311-314.

Dimkpa, C. (2016) Microbial siderophores: Production, detection and application in agriculture and environment. *Endocytobiosis and Cell Research*;27:7-16.

Dinel, H., Schnitzer, M. y Mehuys, G.R. (1990) Soil Lipids: Origin, Nature, Content, Decomposition, and effect on Soil physical properties. En: Bollag, J.M. y Stotzky, G. (Eds.) *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker.

Dinno, A. (2017) dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.5. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>

Donn, S., Kirkegaard, J.A., Perera, G., Richardson, A.E. y Watt, M. (2015) Evolution of Bacterial Communities in the Wheat Crop Rhizosphere. *Environmental Microbiology*;17:610-621.

Dumas, M.T. (1992) Inhibition of *Armillaria* by bacteria isolated from soils of the Boreal Mixedwood Forest of Ontario. *European Journal of Forest Pathology*;22:11-18.

Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Navarro, A., Imperial, J. y Ruiz-Argueso, T. (2013) Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Systematic and Applied Microbiology*;36:128-136.

Dworkin, M. y Foster, J.W. (1958) Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*;75:592-603.

Bibliografía

Eberspächer, J. y Lings, F. (2006) The genus *Phenylobacterium*. The Prokaryotes;5:250-256.

Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. Nature Methods;10:996-998.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C. y Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics;27:2194-2200.

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar S. *et al.* (2015) Structure, variation and assembly of the root-associated microbiomes of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;112:911-920.

Eichlerová, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisá, L., Dobiášová, P. y Baldrian, P. (2015) Enzymatic systems involved in the decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. Fungal Ecology;13:10-22.

Eichorst, S.A. y Kuske, C.R. (2012) Identification of Cellulose-Responsive Bacterial and Fungal Communities in Geographically and Edaphically Different Soils by Using Stable Isotope Probing. Applied and Environmental Microbiology;78:2316-2327.

Ellison, N.W., Liston, A., Steiner, J.J., Williams, W.M. y Taylor, N.L. (2006) Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium—Leguminosae*). Molecular Phylogenetics and Evolution;39:688-705.

Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Spain, A.M., Sheik, C., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O. *et al.* (2008) Novelty and Uniqueness Patterns of Rare Members of the Soil Biosphere. Applied and Environmental Microbiology;74:5422-5428.

Enebak, S.A. (2005) Rhizobacteria isolated from loblolly pine seedlings mediate growth-promotion of greenhouse-grown loblolly, slash and longleaf pine seedlings. Forest Sciences;51:541-545.

Etto, R.M., Cruz, L.M., da Conceição J, E., Galvão, C.W Galvão, F., de Souza, E.M. *et al.* (2014) Seasonal changes in dominant bacterial taxa from acidic peatlands of the Atlantic Rain Forest. Research in Microbiology;165:517-525.

Euzéby, J.P. (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. International Journal of Systematic Bacteriology;47:590-592.

Evans, D.E., Redd, K., Haraysmow, S.E., Elvig, N., Metz, N. y Koutoulis, A. (2014) The Influence of Malt Quality on Malt Brewing and Barley Quality on Barley Brewing with Onda Pro, Compared by Small-Scale Analysis. Journal of American Society of Brewing Chemists;72:192-207.

Fankem, H., Ngo Nkot, L., Deubel, A., Quinn, J., Merbach, W., Etoa, F.X. y Nwada, D. (2008) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameoon. African Journal of Microbiology Research;2:171-178.

FAO. (1998) Global Forest Resources Assessment 2000. Appendix 2. Terms and definitions. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y1997e/y1997e00.htm#Contents>. [Consultado: 10-01-2019].

FAO. (2019) Portal de Suelos de la FAO. Disponible en <http://www.fao.org/soils-portal/es/> [Consultado: 06-06-2019].

Farh, M.E.A., Kim, Y.J., Singh, P., Hoang, V.A. y Yang, D.C. (2016) *Phenylobacterium panacis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rusty mountain ginseng. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;66:2691-2696.

FASTX-Toolkit. (2009) FASTQ/A short-reads pre-processing tools. Download pre-compiled binaries. Disponible en: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/download.html [Consultado: 11-2017].

Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Conde, E. y García-Vallejo, M.C. (1996) Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish Oak Woods. Journal of Agricultural and Food Chemistry;44:1507-1511.

Fernandez, C.W. y Koide, R.T. (2014) Initial melanin and nitrogen concentrations control the decomposition of ectomycorrhizal fungal litter. Soil Biology and Biochemistry;77:150-157.

Fernández González, A.J. (2014) Metagenoma y diversidad microbiana de la rizosfera de quercíneas del Espacio Protegido de Sierra Nevada: efecto del gradiente altitudinal y de un incendio forestal. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Fernández-González, A.J., Martínez-Hidalgo, P., Cobo-Díaz, J.F., Villadas, P.J., Martínez-Molina, E., Toro, N. *et al.* (2017) The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. Scientific Reports;7:6008 doi: 10.1038/s41598-017-06112-3

Fernández-González, A.J., Wentzien, N.M., Villadas, P.J., Lasa, A.V., Gómez-Lama Cabanás, C., *et al.* Comparative study of neighboring tree-associated belowground microbial communities subjected to different soil management. (resultados sin publicar; sometido a Applied and Soil Ecology).

Fernández-López, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haeze, W., Van Montagu, M. y Holsters, M. (1998) Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;95:12724-12728.

Fierer, N. y Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;103:626-631.

Flores-Félix, J.D., Carro, L., Velázquez, E., Valverde, A., Cerda-Castillo, E., García-Fraile, P. *et al.* (2013) *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of

Bibliografía

Phaseolus vulgaris. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;63:821-826.

Flores-Félix, J.D., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Valverde, A., Mateos, P.F., González-Buitrago, J.M. *et al.* (2019) *Phaseolus vulgaris* is nodulated by the symbiovar *viciae* of several genospecies of *Rhizobium laguerreae* complex in a Spanish region where *Lens culinaris* is the traditionally cultivated legume. Systematic and Applied Microbiology;42:240-247.

Fox, J. y Weisberg, S. (2011) An R Companion to Applied Regression. (2ª ed.) Thousand Oaks: Sage Publications.

Franche, C., Lindström, K., y Elmerich C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil;321:35-59.

Frank, B. (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft;7:332-346.

Frasson, D., Opoku, M., Picozzi, T., Torossi, T., Balada, S., Smits, T.H.M. *et al.* (2017) *Pseudomonas wadenswilerensis* sp. nov. and *Pseudomonas reidholzensis* sp. nov., two novel species within the *Pseudomonas putida* group isolated from forest soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;67:2853-2861.

Fred, E.B., Baldwin, I.L., McCoy, E. (1932) Species Relationships. En: Fred, E.B., Baldwin, I.L., McCoy, E. (Eds.) Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison: University of Wisconsin-Madison.

Frey-Klett, P., Pierrat, J.C. y Garbaye, J. (1997) Location and Survival of Mycorrhiza Helper *Pseudomonas fluorescens* during Establishment of Ectomycorrhizal Symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas Fir. Applied and Environmental Microbiology;63:139-144.

Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.L., Best, A.S. y Dunfield, K.E. (2013) Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. American Journal of Botany;100:1738-1750.

Galiana, A., Prin, Y., Mallet, B., Gnahoua, G.M., Poitel, M. y Diem, H.G. (1994) Inoculation of *Acacia mangium* with Alginate Beads Containing Selected *Bradyrhizobium* Strains under Field Conditions: Long-Term Effect on Plant Growth and Persistence of the Introduced Strains in Soil. Applied and Environmental Microbiology;60:3974-3980.

Gans, J., Wolinsky, M. y Dunbar, J. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soils. Science;309:1387-1390.

García, I. y Jiménez-Mejías, P. (2009) 9230 Robledales de *Quercus pyrenaica* y robledales de *Quercus robur* y *Quercus pyrenaica* del Noroeste ibérico. En: VV.AA. Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, y del Medio Rural y Marino.

- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F. y Velázquez, E. (2010) *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Canadian Journal of Microbiology*;56:657-666.
- García-Valdés, E. y Lalucat, J. (2016) *Pseudomonas*: Molecular Phylogeny and Current Taxonomy. En: Kahlon, R.S. (Ed.) *Pseudomonas*: Molecular and Applied Biology. Suiza: Springer.
- Gardner, W.H. (1986) Water content. En: *Methods of Soil Analysis*. (2ª ed.) Madison: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A. y Young, J.P.W. (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;51:2037-2048.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. y Ball, A.S. (2003) Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Applied and Environmental Microbiology*;69:1800-1809.
- Glick, B.R. (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*;251:1-7. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.030
- Glick, B.R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*;2012:963401. doi: 10.6064/2012/963401
- Glick, B.R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*;169:30-39.
- Gobierno de España (1999) "Ley 3/1999 por la que se crea el Parque Nacional de Sierra Nevada", *Boletín Oficial del Estado*, 11 de enero de 1999 (11), pp. 1512-1525.
- Gobierno de España (2003) "Ley 8/2003 de la Flora y Fauna Silvestres", *Boletín Oficial del Estado*, 2 de diciembre de 2003 (288), pp. 42808-42830.
- Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019) Los Incendios Forestales en España. 1 enero-31 diciembre 2018 Avance Informativo. Madrid: MAPA.
- Gobierno de España. Ministerio para la Transición Ecológica. (2019) Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/red-parques-nacionales/nuestros-parques/sierra-nevada/>. [Consultado: 14-06-2019]
- Gómez Zotano, J., Moreno Sánchez, J.J., y Rodríguez Martínez, F. (2005) El incendio de Sierra Nevada (22-24 de septiembre de 2005). Una catástrofe ecológica. *Cuadernos Geográficos*;37:205-214.
- Gómez-Aparicio, L., Zamora, R., Gómez, J.M., Hódar, J.A., Castro, J. y Baraza, E. (2004) Applying plant facilitation to forest restoration: a meta-analysis of the use of shrubs as nurse plants. *Ecological Applications*;14:1128-1138.

Gómez-Lama Cabanás, C., Legarda, G., Ruano-Rosa, D., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Niqui, J.L., *et al.* (2018a) Indigenous *Pseudomonas* spp. Strains from the Olive (*Olea europea* L.) Rhizosphere as Effective Biocontrol Agents against *Verticillium dahliae*: From the Host Roots to the Bacterial Genomes. *Frontiers in Microbiology*;9:277. doi: 10.3389/fmicb.2018.00277

Gómez-Lama Cabanás, C., Ruano-Rosa, D., Legarda, G., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Triviño, J.C. *et al.* (2018b) *Bacillales* members from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture*;8:90. doi:10.3390/agriculture8070090

Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J. y García-Valdés, E. (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*;6:214. doi: 10.3389/fmicb.2015.00214

Good, I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*;40:237-264.

Gordon, S.A. y Weber, R.P. (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*;26:192-195.

Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. y Tiedje, J.M. (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;57:81-91.

Goswami, D., Thakker, J.N. y Dhandhukia, P.C. (2015) Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods*;110:7-14.

Gow, N.A.R., Latge, J.P. y Munro, C.A. (2017) The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*;5. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.

Graham, M.H. (2003) Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. *Ecology*;84:2809-2815.

Griffiths, B.S. y Philippot, L. (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews*;37:112-129.

Guglielmetti, S., Basilico, R., Taverniti, V., Arioli, S., Piagnani, C. y Bernacchi, A. (2013) *Luteibacter rhizovicius* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. *World Journal Microbiology and Biotechnology*;29:2025-2032.

Gutz, H. y Doe, F.J. (1973) Two different *h*- mating types in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*;74:563-569.

- Hackl, E., Pfeffer, M., Donat, C., Bachmann, G. y Zechmeister-Boltenstern, S. (2005) Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biology and Biochemistry*;37:661-671.
- Haichar, F.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J. *et al.* (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*;2:1221-1230.
- Hajnal-Jafari, T.H., Jarak, M., Đurić, S., Stamenov, D. y Orlović, S. (2014) The effects of microbial inocula on the growth of black locust, Siberian elm and silver maple seedlings. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*;127:15-22.
- Hallmann, A.Q., Kloeppler, J.W., y Benhamou, N. (1997) Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*;43:577-582.
- Han, T.X., Wang, E.T., Wu, L.J., Chen, W.F., Gu, J.G., Gu, C.T. *et al.* (2008) *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;58:1693-1699.
- Hao, X., Xie, P., Johnstone, L., Miller, S.J., Rensing, C. y Wei, G. (2012) Genome Sequence and Mutational Analysis of Plant-Growth-Promoting Bacterium *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 Isolated from a Zinc-Lead Mine Tailing. *Applied and Environmental Microbiology*;78:5384-5394.
- Hasan, S.A. y Jabeen, S. (2015) Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*;29:45-53.
- Hashidoko, Y., Nakayama, T., Homma, Y. y Tahara, S. (1999) Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. *Tetrahedron Letters*;40:2957-2960.
- Hatzinger, P.B., Palmer, P., Smith, R.L., Penarrieta, C.T. y Yoshinari, T. (2003) Applicability of tetrazolium salts for the measurement of the respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*;52:47-58.
- Heinonsalo, J., Frey-Klett, P., Pierrat, J.C., Churin, J.L., Vairelles, C.D. y Garbaye, J. (2004) Fate, tree growth effect and potential impact on soil microbial communities of mycorrhizal and bacterial inoculation in a forest plantation. *Soil Biology and Biochemistry*;36:211-216.
- Hernandez-Agreda, A., Gates, R.D. y Ainsworth, T.D. (2017) Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends in Microbiology*;25:125-140.
- Hernández-Santana, V., Martínez-Fernández, J., Morán, C. y Cano, A. (2008) Response of *Quercus pyrenaica* (melojo oak) to soil water deficit: a case study in Spain. *European Journal of Forest Research*;127:369-378.
- Herrmann, L., Sanon, K., Zoubeirou, A.M., Dianda, M., Sall, S., Thuita, M. *et al.* (2012) Seasonal changes of bacterial communities in the rhizosphere of *Acacia senegal*

Bibliografía

mature trees inoculated with *Ensifer* strains in Burkina Faso and Niger. *Agriculture, Ecosystems and Environment*;157:47-53.

Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y. y Jurkevitch, E. (2005) Inoculation with the Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Causes Little Disturbance in the Rhizosphere and Rhizoplane of Maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology*;50:277-288.

Herzog, S., Wemheuer, F., Wemheuer, B. y Daniel, R. (2015) Effects of Fertilization and Sampling Time on Composition and Diversity of Entire and Active Bacterial Communities in German Grassland Soils. *PLoS ONE*;10:e0145575. doi: 10.1371/journal.pone.0145575

Hiltner, L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Broche. *Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft Arb*;98:59-78.

Ho, A., Kerckhof, F.M., Luke, C., Reim, A., Krause, S., Boon, N. *et al.* (2013) Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. *Environmental Microbiology Reports*;5:335-345.

Hoffman, M.T., Gunatilaka, M.K., Wijeratne, K., Gunatilaka, L. y Elizabeth, A. (2013) Endohyphal Bacterium Enhances Production of Indole-3-Acetic Acid by a Foliar Fungal Endophyte. *PLoS ONE*;8:e73132. doi :10.1371/journal.pone.0073132

Hong, S., Piao, S., Chen, A., Liu, Y., Liu, L., Peng, S. *et al.* (2018) Afforestation neutralizes soil pH. *Nature Communications*;9:520. doi: 10.1038/s41467-018-02970-1

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P. y Heiberger, R.M. (2008) multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric models. R package version 1.0-0. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=multcomp>

Huey, B. y Hall, J. (1989) Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology*;171:2528-2532.

Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H. y Bohannan B.J.M. (2001) Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*;67:4399-4406.

Hunt, D.E., Lin, Y., Church, M.J., Karl, D.M., Tringe, S.G., Izzo, L.K. *et al.* (2013) Relationship between Abundance and Specific Activity of Bakterioplankton in Open Ocean Surface Waters. *Applied and Environmental Microbiology*;79:177-184.

Hurlbert, S.H. (1971) The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. *Ecology*;52:577-586.

Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G. y Sogin, M.L. (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*;12:1889-1898.

- Illakkiam, D., Anuj, N.L., Ponraj, P., Shankar, M., Rajendhran, J. y Gunasekaran, P. (2013) Proteolytic enzyme mediated antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* against *Macrophomina phaseolina*. Indian Journal of Experimental Biology;51:1024-1031.
- Illmer, P. y Schinner, F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biology and Biochemistry;24:389-395.
- Illmer, P. y Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates—Solubilization mechanisms. Soil Biology and Biochemistry;27:257-263.
- Illumina (2011). Quality Scores for Next-Generation Sequencing. Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring. Technical Note: Sequencing. Disponible en: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf [Consultado: 02-03/2019].
- Ishikura, Y., Kojima, Y. y Terazawa, M. (2001) Effects of Phenolic Compounds on Seed Germination of Shirakamba Birch, *Betula platyphylla* var. *japonica*. Eurasian Journal of Forest Research;2:17-25.
- Jambu, P., Mouçawi, J., Fustec, E., Amblès, A. y Jacquesy, R. (1985) Inter-relation entre pH et la nature des composés lipidiques du sol: étude comparée d'une rendzine et d'un sol lessivé glossique. Agrochimica-Pisa;29:186-198.
- Jauregui, B.M., Celaya, R., Garcia, U. y Osoro, K. (2007) Vegetation dynamics in burnt heather-gorse shrublands under different grazing management with sheep and goats. Agroforestry Systems;70:103-111.
- Jha, S., Modi, H.A. y Jha, C.K. (2016) Characterization of extracellular chitinase produced from *Streptomyces rubiginosus* isolated from rhizosphere of *Gossypium* sp. Cogent Food and Agriculture;2:1198225. doi: 10.1080/23311932.2016.1198225
- Jiao, Y.S., Yan, H., Ji, Z.J., Liu, Y.H., Sui, X.H., Wang, E.T. et al. (2015) *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;65:497-503.
- Jiménez Sancho, M.P., Díaz-Fernández, P.M. y Gil, L. (1997) Regiones de procedencia de *Quercus pyrenaica* Willd., *Q. faginea* Lam. y *Q. canariensis* Willd. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales;5:135-141.
- Johansen, J.E., Binnerup, S.J., Kroer, N. y Mølbak, L. (2005) *Luteibacter rhizovicius* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;55:2285-2291.
- Jolles, P. y Muzzarelli, R.A.A. (1999) Chitin and Chitinases. Basel: Springer.
- Jones, S.E. y Lennon, J.T. (2010) Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;107:5881-5886.

Bibliografía

Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. y Fierer, N. (2009) A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal*;3:442-453.

Joo, G.J., Kim, Y.M., Kim, J.T., Rhee, I.K., Kim, J.H. y Lee, I.J. (2005) Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *Journal of Microbiology*;43:510-515.

Jordan, D.C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic and Bacteriology*;32:136-139.

Jordan, D.C. (1984) Family III. *Rhizobiaceae*. En: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins.

Junta de Andalucía (1994) "Decreto 104/1994 por el que se establece el Catálogo Andaluz de Especies de la Flora Silvestre Amenazada", *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía*, 19 de mayo de 1994 (107), pp. 7948-7953.

Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. (2019) Espacio Natural de Sierra Nevada. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem.f497978fb79f8c757163ed105510e1ca/?vgnnextoid=22d7670faa46e310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=22d7670faa46e310VgnVCM2000000624e50aRCRD> [Consultado: 14-06-2019]

Kalai-Grami, L., Slimane, I.B., Mnari-Hattab, M., Rezgui, S., Aouani, M.A., Hajlaoui, M.R. et al. (2014) Protective effect of *Bacillus amyloliquefaciens* against infections of *Citrus aurantium* seedlings by *Phoma tracheiphila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*;30:529-538.

Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N. y Lugtenberg, B. (2006) Effects of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the Composition of Organic Acids and Sugars in Tomato Root Exudate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;19:1121-1126.

Kaminsky, L.M., Trexler, R.V., Malik, R.J., Hockett, K.L. y Bell, T.H. (2019) The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants. *Trends in Biotechnology*;37:140-151.

Kang, S.M., Radhakrishnan, R., Khan, A.L., Kim, M.J., Park, J.M., Kim, B.R. et al. (2014) Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*;84:115-124.

Karlić, V., Čurguz, V.G. y Raićević, V. (2016) The alleviation of reforestation challenges by beneficial soil microorganisms. *Reforesta*;1:238-260.

Karlić, V., Radić, D., Jovičić Petrović, J., Golubović-Čurguz, V., Kiković, D. y Raićević, V. (2015) Inoculation of *Robinia pseudoacacia* L. and *Pinus sylvestris* L.

seedlings with plant growth promoting bacteria causes increased growth in coal mine overburden. International Conference Reforestation Challenges. Belgrado, 03-06 junio 2015. Belgrado: Reforesta.

Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M. & Sahin, F. (2007) Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae*;114:16-20.

Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. (2008) A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*;57:503-507.

Katoh, K. y Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*;30:772-780.

Kawase, T., Saito, A., Sato, T., Kanai, R., Fujii, T., Nikaidou, N., *et al.* (2004) Distribution and Phylogenetic Analysis of Family 19 Chitinases in Actinobacteria. *Applied Environmental Microbiology*;70:1135-1144.

Kearns, P.J., Angell, J.H., Howard, E.M., Deegan, L.A., Stanley, R.H.R. y Bowen, J.L. (2016) Nutrient enrichment induces dormancy and decreases diversity of active bacteria in salt marsh sediments. *Nature Communications*;7:12881. doi: 10.1038/ncomms12881

Keel, C., Schider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, K., Burger, U. *et al.* (1992) Suppression of Root Diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the Bacterial Secondary Metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;5:4-13.

Keith, S.D. y Arnosti C. (2001) Extracellular Enzyme Activity in a River-Bay-Shelf Transect: Variations in Polysaccharide Hydrolysis Rates with Substrate and Size Class. *Aquatic Microbial Ecology*;24:243-253.

Khan, A., Singh, P. y Srivastava, A. (2018) Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*;212-213:103-111.

Kielak, A.M., Cretoiu, M.S., Semeov, A.V., Sørensen, S.J. y Elsas, J.D. (2013) Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*;79:263-272.

Kim, B.S., Moon, S.S. y Hwang, B.K. (1999) Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany*;77:850-858.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*;16:111-120.

Klein, A.M., Bohannon, B.J.M., Jaffe, D.A., Levin, D.A. y Green, J.L. (2016) Molecular Evidence for Metabolically Active Bacteria in the Atmosphere. *Frontiers in Microbiology*;7:772. doi: 10.3389/fmicb.2016.00772

Kluepfel, D.A., Nyczepir, A.P., Lawrence, J.E., Wechter, W.P. y Leverentz, B. (2002) Biological Control of the Phytoparasitic Nematode *Mesocriconema xenoplax* on Peach Trees. *Journal of Nematology*;34:120-123.

Knief, C. (2014) Analysis of plant microbiome interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science*;5:216. doi:10.3389/fpls.2014.00216

Koeck, D.E., Pechtl, A., Zverlov, V.V. y Schwarz, W.H. (2014) Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*;29:171-183.

Kojima, Y. y Shimizu, S. (2003) Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*;96:219-226.

Kuhad, R.C., Singh, S., Lata, Singh, A. (2011) Phosphate-Solubilizing Microorganisms. En: Singh A., Parmar N., Kuhad R.C. (Eds.) *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Berlin: Springer

Kumar, V. y Narula, N. (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*;28:301-305.

Kuzyakov, Y. y Cheng, W. (2001) Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*;33:1915-1925.

Kwaśna, H. (2004) Natural shifts in communities of rhizosphere fungi of common oak after felling. *Plant and Soil*;264:209-218.

Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. y Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*;147:981-993.

Land, M., Hauser, L., Jun, S.R., Nookaew, I., Leuze, M.R., Ahn, T.H. *et al.* (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional and Integrative Genomics*;15:141-161.

Lasa, A.V., Fernández-González, A.J., Villadas, P.J., Toro, N. y Fernández-López, M. (2019a) Metabarcoding reveals that rhizospheric microbiota of *Quercus pyrenaica* is composed by a relatively small number of bacterial taxa highly abundant. *Scientific Reports*;9:1695. doi: 10.1038/s41598-018-38123-z

Lasa, A.V., Mašinová, T., Baldrian, P. y Fernández-López, M. (2019b) Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. *PLoS ONE*;14:e0214422. doi: 10.1371/journal.pone.0214422

- Lasanta Martínez, T., González-Hidalgo, J.C., Vicente Serrano, S.M., Sferi, E. (2006). Using landscape ecology to evaluate an alternative management scenario in abandoned Mediterranean mountain areas. *Landscape and Urban Planning*;78:101-114.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. y Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*;75:5111-5120.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A. y Fierer, N. (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*;40:2407-2415.
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C. *et al.* (1998) Characterization of the *hcnABC* Gene Cluster Encoding Hydrogen Cyanide Synthase and Anaerobic Regulation by ANR in the Strictly Aerobic Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*;180:3187-3196.
- Leigh, M.B., Prouzová, P., Macková, M., Macek, T., Nagle, D.P. y Fletcher, J.S. (2006) Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site. *Applied and Environmental Microbiology*;72:2331-2342.
- Lennon, J.T. y Jones, S.E. (2011) Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews. Microbiology*;9:119-130.
- Leonard, L.T. (1943) A Simple Assembly for Use in the Testing of Cultures of Rhizobia. *Journal of Bacteriology*;45:523-527.
- Lewis, K.A., Tzivilakis, J., Warner, D. y Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*;22:1050-1064.
- Li, J., Dai, J., Chen, X. y Zhu, P. (2007) Microbial Transformation of Cephalomannine by *Luteibacter* sp. *Journal of Natural Products*;70:1846-1849.
- Li, H., Ye, D., Wang, X., Settles, M.L., Wang, J., Hao, Z. *et al.* (2014) Soil bacterial communities of different natural forest types in Northeast China. *Plant and Soil*;383:203-216.
- Lingens, F., Blecher, R., Blecher, H., Blobel, F., Eberspächer, J., Fröhner, C. *et al.* (1985) *Phenylobacterium immobile* gen. nov., sp. nov., a Gram-Negative Bacterium That Degrades the Herbicide Chloridazon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;35:26-39.
- Liu, J., Ha, V.N., Shen, Z., Zhu, H., Zhao, F. y Zhao, Z. (2018) Characteristics of bulk and rhizosphere soil microbial community in an ancient *Platycladus orientalis* forest. *Applied Soil Ecology*;132:91-98.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R. y Baldrian, P. (2017) Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*;81:e00063-16. doi: 10.1128/MMBR.00063-16

Lladó, S., López-Mondéjar, R. y Baldrian, P. (2018) Drivers of microbial community structure in forest soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*;102:4331-4338.

Lladó, S., Žifčáková, L., Větrovský, T., Eichlerová, I. y Baldrian P. (2016) Functional screening of abundant bacteria from acidic forest soil indicates the metabolic potential of Acidobacteria subdivision 1 for polysaccharide decomposition. *Biology and Fertility of Soils*;52:251-260.

Llorent-Martínez, E.J., Ortega-Barrales, P., Zengin, G., Mocan, A., Simirgiotis, M.J., Ceylan, R. *et al.* (2017) Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: Potential sources of bioactive compounds for the food industry. *Food and Chemical Toxicology*;107:609-619.

Long, H.H., Schmidt, D.D. y Baldwin, I.T. (2008) Native Bacterial Endophytes Promote Host Growth in a Species-Specific Manner; Phytohormone Manipulations Do Not Result in Common Growth Responses. *PLoS ONE*;3:e2702. doi:10.1371/journal.pone.0002702

Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Davis II, E.W., Lim, C.K., Shaffer, B.T. *et al.* (2012) Comparative Genomics of Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Insights into Diversity and Inheritance of Traits Involved in Multitrophic Interactions. *PLoS Genetics*;8:e1002784. doi: 10.1371/journal.pgen.1002784

López-Mondéjar, R., Brabcová, V., Štursová, M., Davidová, A., Jansa, J., Cajthaml, T. *et al.* (2018) Decomposer food web in a deciduous forest shows high share of generalist microorganisms and importance of microbial biomass recycling. *The ISME Journal*;12:1768-1778.

López-Mondéjar, R., Voříšková, J., Větrovský, T. y Baldrian, P. (2015) The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biology and Fertility*;87:43-50.

López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K. y Baldrian P. (2016a) Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*;6: 25279. doi: 10.1038/srep25279

López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Větrovský, T., Becher, D., Riedel, K. y Baldrian, P. (2016b) Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199. *Biotechnology for Biofuels*. 2016;9:104. doi: 10.1186/s13068-016-0518-x

Lora González, A., Muñoz Macías, F. y Morales Jiménez, L. (2008) Estado actual y propuestas para la mejora de la situación del rebollo (*Quercus pyrenaica* Will.) en el Parque Natural Sierra Norte de Sevilla. En: Junta de Andalucía Consejería de Medio Ambiente (Ed.) Investigación científica y conservación en el Parque Natural Sierra Norte de Sevilla. Sevilla.

Loreau, M., Naeem, S. y Inchausti, P. (2002) Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives. New York:Oxford University Press.

Louca, S., Parfrey, L.W. y Doebeli, M. (2016) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*;353:1272-1277.

Louca, S., Polz, M.F, Mazel, F., Albright, M.B.N., Huber, J.A., O'Connor, M.I. *et al.* (2018) Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology and Evolution*;2:936-943.

Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., y Knight, R. (2007) Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*;73:1576-1585.

Lozupone, C. y Knight, R. (2005) UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*;71:8228-8235.

Lucas-García, J.A., Domenech, J., Santamaría, C., Camacho, M., Daza, A. y Gutiérrez Mañero, F.J. (2004) Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany* 52:239-251.

Lueders, T., Kindler, R., Miltner, A., Friedrich, M.W. y Kaestner, M. (2006) Identification of Bacterial Micropredators Distinctively Active in a Soil Microbial Food Web. *Applied and Environmental Microbiology*;72:5342-5348.

Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Herrera Paredes, S., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S. *et al.* (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*;488:86-90.

Luque, J., Parladé, J. y Pera, J. (2000) Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology*;30:247-263.

Luque, J., Parladé, J. y Pera, J. (2002) Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*;51:338-345.

Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J.F., Rees, R.M. y Peyraud, J.L. (2014) Potential of legume-based grassland–livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science*;69:206-228.

Lyal, C., Kirk, P., Smith, D. y Smith, R. (2008) The value of taxonomy to biodiversity and agriculture. *Biodiversity*;9:8-13.

Lynch, M.D.J. y Neufeld, J.D. (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology*;13:217-229.

Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Ferreira, E.M., Binoti, D.H.B., Machado, G., Mafia, V. y Munteer, A.H. (2009) Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and *Eucalyptus* species. *Revista Árvore*;33:1-9.

Bibliografía

- Maghnia, F.Z., Abbas, Y., Mahé, F., Prin, Y., El Ghachtouli, N., Duponnois, R. *et al.* (2019) The rhizosphere microbiome: A key component of sustainable cork oak forests in trouble. *Forest Ecology and Management*;434:29-39.
- Magurran, A.E. (2004) *Measuring Biological Diversity*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Malhi, Y., Baldocchi, D.D. y Jarvis, P.G. (1999) The carbon balance of tropical, temperate and boreal forests. *Plant, Cell and Environment*;22:715-740.
- Mallon, C.A., Le Roux, X., van Doorn, G.S., Dini-Andreote, F., Poly, F. y Salles, J.F. (2018) The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. *The ISME Journal*;12:728-741.
- Mallon, C.A., van Elsas, J.D. y Salles, J.F. (2015) Microbial Invasions: The Process, Patterns, and Mechanisms. *Trends in Microbiology*;23:719-729.
- Marchesi, J.R. y Ravel, J. (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*;3:31. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5
- Marques, J.M., da Silva, T.F., Vollu, R.E., Blank, A.F., Ding, G.C., Seldin, L. *et al.* (2014) Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*;88:424-435.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. (2ª ed.) London: Academic Press.
- Martin, J.A., Macaya-Sanz, D., Witzell, J., Blumenstein, K. y Gil, L. (2015) Strong *in vitro* antagonism by elm xylem endophytes is not accompanied by temporally stable *in planta* protection against a vascular pathogen under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*;142:185-196.
- Martínez Parras, J.M. y Molero Mesa, J. (1982) Ecología y fitosociología de *Quercus pyrenaica* Willd., en la provincia Bética. Los melojares béticos y sus etapas de sustitución. *Lazaroa*;4:91-104.
- Martínez-Arbizu, P. (2017) pairwiseAdonis: Pairwise Multilevel Comparison using Adonis. R package version 0.0.1. Disponible en: <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis>
- Martínez-Romero, E. (2009) Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? DNA and Cell Biology;28:361:370.
- Mašinová T., Yurkov, A. y Baldrian, P. (2018) Forest soil yeasts: Decomposition potential and the utilization of carbon sources. *Fungal Ecology*;34:10-19.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D y Défag, G. (1998) Salicylic Acid Biosynthetic Genes Expressed in *Pseudomonas fluorescens* Strain P3 Improve the Induction of Systemic Resistance in Tobacco Against Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology*;88:678-684.

Mavrodi, D.V., Parejko, J.A., Mavrodi, O.V., Kwak, Y.S., Weller, D.M., Blankenfeldt, W. *et al.* (2013) Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*;15:675-686

Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B.R. (1999) Effect of Wild-Type and Mutant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Rooting of Mung Bean Cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation*;18:49-53.

Mayer, A.M. (1958) Determination of Indole Acetic Acid by the Salkowsky Reaction. *Nature*;182:1670-1671.

McCarthy, J.J., Canziani, O.F., Leary, N., Dokken, D.J. y White, K.S. (2001) Climate change 2001: Impacts, adaptation, and vulnerability. Contribution of Working Group II to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). New York: Cambridge University Press.

McMurdie, P.J. y Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*;8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217

McMurdie, P.J., y Holmes, S. (2014) Waste Not, Want not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology* 10:e1003531. doi:10.1371/journal.pcbi.1003531

Meaden, S., Metcalf, C.J.E. y Koskella, B. (2016) The effects of host age and spatial location on bacterial community composition in the English Oak tree (*Quercus robur*). *Environmental Microbiology Reports*;8:649-658.

Mebius, L.J. (1960) A rapid method for the determination of organic carbon in soil. *Analytica Chimica Acta*;22:120-124.

Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Alaiz, M. y Vioque, J. (2016) Purification of canavanine from the legume *Vicia disperma*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*;5:150-154.

Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J.H. *et al.* (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*;332:1097-1100.

Menéndez, E., García-Fraile, P. y Rivas, R. (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioengineering*;2:163-182.

Mercado-Blanco, J. (2015) *Pseudomonas* Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. En: *Pseudomonas*. Ramos, J.L., Goldberg, J.B. y Filloux, A. (Eds.) *Pseudomonas*. Dordrecht: Springer.

Mesanza, N., Iturriza, E. y Patten, C.L. (2016) Native Rhizobacteria as biocontrol agents of *Heterobasidion annosum* s.s. and *Armillaria mellea* infection of *Pinus raditata*. *Biological Control*;101:8-16.

Bibliografía

Migula, W. (1894) Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe;1:235-238.

Milagres, A.M.F., Machuca, A. y Napoleão, D. (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiology Methods;37:1-6.

Millennium Ecosystem Assessment. (2005) Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Washington: Island Press.

Milner, J.L., Silo-Suh, L., Lee, J.C. He, H., Clardy, J. y Handelsman, J. (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. Applied and Environmental Microbiology;62:3061-3065.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018) Anuario de Estadística Forestal 2014-2015. Madrid: MAPA, Secretaría General Técnica Centro de Publicaciones.

Montalvo, M.I., García, B., Luis, E. y Gómez, J.M. (1980) Influencia del arbolado sobre la composición química de la hierba. Anales de Edafología y Agrobiología;39:1287-1305.

Montañez, A., Abreu, C., Gill, P.R., Gill, P.R., Hardarson, G. y Sicardi, M. (2009) Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biology and Fertility of Soils;45:253-263.

Moran, M.A., Satinsky, B., Gifford, S.M., Luo, H., Rivers, A., Chan, L.K. *et al.* (2013) Sizing up metatranscriptomics. The ISME Journal;7:237-243.

Moreno Marcos, G y Gallardo Lancho, J.F. (2002) Atmospheric deposition in oligotrophic *Quercus pyrenaica* forests: implications for forest nutrition. Forest Ecology and Management;171:17-19.

Moricca, S., Linaldeddu, B.T., Ginetti, B., Scanu, B., Franceschini, A. y Ragazzi, A. (2016) Endemic and Emerging Pathogens Threatening Cork Oak Trees: Management Options for Conserving a Unique Forest Ecosystem. Plant Disease;100:2184-2193.

Mühling, M., Woolven-Allen, J., Colin Murrel, J. y Joint I. (2008) Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. The ISME Journal;2:379-392.

Mulet, M., Bennasar, A., Lalucat, J. y García-Valdés, E. (2009) An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. Molecular and Cellular Probes;23:140-147.

Mulet, M., Lalucat, J. y García-Valdés, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology;12:1513-1530.

Nacke, H., Fischer, C., Thürmer, A., Meinicke, P. y Daniel, R. (2014) Land Use Type Significantly Affects Microbial Gene Transcription in Soil. Microbial Ecology;67:919-930.

Nacke, H., Türmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N. *et al.* (2011) Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS ONE*;6:e17000. doi: 10.1371/journal.pone.0017000

Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M. y Arshad, M. (2007). Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Canadian Journal of Microbiology*;53:1141-1149.

Naik, P.R., Sahoo, N., Goswami, D., Ayyadurai, N. y Sakthivel, N. (2008) Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial Ecology*;56:492-504.

Nakatsukasa, H., Uchiumi, T., Kucho, K., Suzuki, A., Higashi, S. y Abe, M. (2008) Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii to become a symbiosis island in *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology*;54:107-118.

Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J. y Tahara, S. (1999). Possible role of Xanthobaccins Produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in Suppression of Sugar Beet Damping-Off Disease. *Applied Environmental Microbiology*;65:4334-4339.

Nanamiya, H., Sato, M., Masuda, K., Sato, M., Wada, T., Suzuki, S. *et al.* (2010) *Bacillus subtilis* mutants harbouring a single copy of the rRNA operon exhibit severe defects in growth and sporulation. *Microbiology*;156:2944-2952.

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. y Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. En: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.) Phosphorus in Action. Biological processes in soil phosphorus cycling. Heidelberg: Springer.

Narożna, D., Pudełko, K., Króliczak, J., Golińska, B., Sugawara, M., Mądrzak, C.J. *et al.* (2015) Survival and Competitiveness of *Bradyrhizobium japonicum* 20 Years after Introduction into Field Location in Poland. *Applied and Environmental Microbiology*;81:5552-5559.

Nascimento, F.X., Vicente, C.S.L., Barbosa, P., Espada, M., Glick, B.R., Oliveira, S. *et al.* (2013) Evidence for the involvement of ACC deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 in the biocontrol of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Biocontrol*;58:427-433.

Nautiyal, C. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*;170:265-270.

Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M. y Sessitsch, A. (2014) The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and Fertility of Soils*;50:249-262.

Neter, J.M., Kutner, H., Nachtsheim, C.J. y Wasserman, W. (1996) Applied Linear Statistical Methods. Chicago: Irwin McGraw Hill.

Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. y Sørensen, J. (1999) Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *Journal of Applied Microbiology*;86:80-90.

Nieto Quintano, P., Caudullo, G. y de Rigo, D. (2016) *Quercus pyrenaica* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. En: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T. y Mauri, A. (Eds.) *European Atlas of Forest Tree Species*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Nonnoi, F., Chinnaswamy, A., García de la Torre, V.S., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M. y Pueyo, J.J. (2012) Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*;61:49-59.

Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J. y Loper, J.E. (1999) Characterization of the Pyoluteorin Biosynthetic Gene Cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*;181:2166-2174.

O'Neill, G.A., Radley, R.A. y Chanway, C.P. (1992) Variable effects of emergence-promoting rhizobacteria on conifer seedling growth under nursery conditions. *Biology and Fertility of Soils*;13:45-49.

O'Sullivan, D.J. y O'Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews*;56:662-676.

Oksanen, J. (2012) Constrained Ordination: Tutorial with R and vegan. Disponible en: www.cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/session2res.pdf [Consultado: 02-03-2019].

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., *et al.* (2016) *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-1. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Okubo, T., Tsukui, T., Maita, H., Okamoto, S., Oshima, K., Fujisawa, T. *et al.* (2012) Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium* sp. S2321: Insights into Symbiosis Evolution in Soil Oligotrophs. *Microbes and Environments*;27:306-315.

Olcott, M.H., Henkels, M.D., Rosen, K.L., Walker, F.L., Sneh, B., Loper, J.E. *et al.* (2010) Lethality and Developmental Delay in *Drosophila melanogaster* Larvae after Ingestion of Selected *Pseudomonas fluorescens* Strains. *PLoS ONE*;5:e12504. doi: 10.1371/journal.pone.0012504

Olivares, J., Casadesús, J. y Bedmar, E.J. (1980) Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Applied and Environmental Microbiology*;39:967-970.

Ortiz-Álvarez, R., Fierer, N., de los Ríos, A., Casamayor, E.O. y Barberán, A. (2018) Consistent changes in the taxonomic structure and functional attributes of bacterial communities during primary succession. *The ISME Journal*;12:1658-1667.

- Paik, J., Low, N.H., y Ingledew, W.M. (1991) Malt Extract: Relationship of Chemical Composition to Fermentability. *Journal of American Society of Brewing Chemists*;49:8-13.
- Palahí, M., Mavsar, R., Gracia, C. y Birot, Y. (2008) Mediterranean forests under focus. *International Forestry Review*;10:676-688.
- Paliy, O. y Shankar, V. (2016) Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*;25:1032-1057.
- Pandya, N.D. y Desai, P.V. (2014) Screening and characterization of GA₃ producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*;3:110-115.
- Papp, K., Hungate, B.A. y Schwartz, E. (2018) Microbial rRNA Synthesis and Growth Compared through Quantitative Stable Isotope Probing with H₂¹⁸O. *Applied and Environmental Microbiology*;84:e02441-17. doi: 10.1128/AEM.02441-17
- Paradis, E. y Schliep, K. (2018) ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*;35:526-528.
- Parameswaran, P., Jalili, R., Tao, L., Shokralla, S., Gharizadeh, B., Ronaghi, M. *et al.* (2007) A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Research*;35:e130. doi: 10.1093/nar/gkm760
- Pascual, J., García-López, M., Bills, G.F. y Genilloud, O. (2015) *Pseudomonas granadensis* sp.nov., a new bacterial species isolated from the Tejeda, Almijara and Alhama Natural Park, Granada, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;65:625-632.
- Pascual, J., García-López, M., Carmona, C., da Sousa, T., de Pedro, N., Cautain, B. *et al.* (2014) *Pseudomonas soli* sp. nov., a novel producer of xantholysin congeners. *Systematic and Applied Microbiology*;37:412-416.
- Pascual, J., Macián, M.C., Arahal, D.R., Garay, E. y Pujalte, M.J. (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;60:154-165.
- Pausas, J.G. (2004) Changes in Fire and Climate in the Eastern Iberian Peninsula (Mediterranean basin). *Climatic Change*;63:337-350.
- Pegg, G.F. (1981) Biochemistry and physiology of pathogenesis. En: Mace, M.E., Bell, A.A., y Beckman C.H. (Eds.) *Fungal Wilt Diseases of Plants*. New York: Academic Press.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L. *et al.* (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;110:6548-6553.

Bibliografía

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. y Velázquez, E. (2018) The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*;57:106-116.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E. y Bedmar, E.J. (2015) Bacterial Association with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*;34:17-42.

Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Rodríguez-Berruero, C., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2001) Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*;33:103-110.

Penrose, D.M. y Glick, B.R. (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*;118:10-15.

Pérez-Luque, A.J., Pérez-Pérez, R. y Bonet, F.J. (2015a) Evolución del clima en los últimos 50 años en Sierra Nevada. En: Zamora, R., Pérez-Luque, A.J., Bonet, F.J., Barea-Azcón, J.M. y Aspizua, R. (Eds.) *La huella del cambio global en Sierra Nevada: Retos para la conservación*. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.

Pérez-Luque, A.J., Pérez-Pérez, R., Aspizua, R., Muñoz, J.M. y Bonet, F.J. (2015b) El clima en Sierra Nevada: presente y futuro. En: Zamora, R., Pérez-Luque, A.J., Bonet, F.J., Barea-Azcón, J.M. y Aspizua, R. (Eds.) *La huella del cambio global en Sierra Nevada: Retos para la conservación*. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.

Pérez-Yépez, J., Armas-Capote, N., Velázquez, E., Pérez-Galdona, R., Rivas, R. y León-Barrios, M. (2014) Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium*: Resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. *Systematic and Applied Microbiology*;37:553-559.

Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W.J. (2000) Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*;64:180-201.

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. y van der Putten, W.H. (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews*;11:789-799.

Piagnani, M.C., Guglielmetti, S. y Parini, C. (2007) Identification and effect of two bacterial contaminants on apple organogenesis. *Acta Horticulturae*;738:335-39.

Pielou, E.C. (1969) *An introduction to mathematical ecology*. New York: WileyInterscience.

Pielou, E.C. (1975) *Ecological diversity*. New York: Wiley InterScience.

Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G. y Nannipieri, P. (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*;45:219-235.

Pliego, C., Cazorla, F.M., González-Sánchez, M.A., Pérez-Jiménez, R.M., de Vicente, A. y Ramos, C. (2007) Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology*;158:463-470.

Prakash, O., Sharma, R., Singh, P. y Yadav, A. (2016) Strategies for Taxonomical Characterisation of Agriculturally Important Microorganisms. En: Singh, D., Singh, H. y Prabha, R. (Eds.) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. New Delhi: Springer.

Prashar, P., Kapoor, N. y Sachdeva, S. (2013) Biocontrol of Plant Pathogens Using Plant Growth Promoting Bacteria. En: Lichtfouse, E. (Ed.) *Sustainable Agriculture Reviews*. Dordrecht: Springer.

Price, M.N., Dehal, P.S. y Arkin, A.P. (2010) FastTree 2 — Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*;5:e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490

Probanza, A., Lucas García, J.A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B. y Gutiérrez Mañero, F.J. (2002) *Pinus pinea* L. seedlings growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*;20:75-84.

Probanza, A., Mateos, J.L., Lucas García, J.A., Ramos, B., de Felipe, M.R. y Gutierrez Mañero, F.J. (2001) Effects of Inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. Growth, Bacterial Rhizosphere Colonization, and Mycorrhizal Infection. *Microbial Ecology*;41:140-148.

Puente, M.L., Garcia, J.E., Pathauer, P. y Peticari, A. (2010) Inoculation with *Azospirillum brasiliense* is a Useful Tool in *Eucalyptus globulus* management. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*;8:124-130.

Pueppke, S. y Broughton, W.J. (1999) *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *Molecular Plant-Microbe interactions*;12:293-318.

Puopolo, G., Cimmino, A., Palmieri, M.C., Giovannini, O., Evidente, A. y Pertot, I. (2014) *Lysobacter capsici* AZ78 produces cyclo(l-Pro-l-Tyr), a 2,5-diketopiperazine with toxic activity against sporangia of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. *Journal of Applied Microbiology*;117:1168-1180.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. *et al.* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*;41:590-596.

Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M., Read, L.F. *et al.* (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods*;6:639-642.

Bibliografía

Quoreshi, A.M., Piché, Y. y Khasa, D.P. (2008) Field performance of conifer and hardwood species 5 years after nursery inoculation in the Canadian Prairie Provinces. *New Forests*;35:235-253.

R Development Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I. y de Kock, M.J.D. (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;19:699-710.

Rajendhran, J. y Gunasekaran, P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*;166:99-110.

Ramette, A. (2007) Multivariate analysis in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*;62:142-160.

Ramírez-Bahena, M.H., Cuesta, M.J., Flores-Félix, J.D., Mulas, R., Rivas, R., Castro-Pinto, J. *et al.* (2014) *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;64:2338-2345.

Ramírez-Bahena, M.H., Cuesta, M.J., Tejedor, C., Igual, J.M., Fernández-Pascual, M. y Peix, A. (2015) *Pseudomonas endophytica* sp. nov., isolated from stem tissue of *Solanum tuberosum* L. in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;65:2110-2117.

Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M. *et al.* (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1989^{AL}, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926^{AL} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL}. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum* DSM30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;58:2484-2490.

Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Peix, A., Martínez-Molina, E. y Mateos, P.F. (2009) Phenotypic, genotypic, and symbiotic diversities in strains nodulating clover in different soils in Spain. *Canadian Journal of Microbiology*;55:1027-1216.

Ramírez-Gil, J.G., Castañeda Sánchez, D.A. y Morales Osorio, J.G. (2014) Alternativas microbiológicas para el manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands., en *Persea americana* Mill. bajo condiciones de casa-malla. *Cultivos Tropicales*;35:19-27.

Rapini, A. (2014) Introduction to Botanical Taxonomy. En: Albuquerque, U. P., Fernandez Cruz da Cunha, L.V., Paiva de Lucena, R.F. y Nóbrega Alves, R.R. (Eds.) *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. New York: Springer.

Rascovan, N., Carbonetto, B., Perrig, D., Díaz, M., Canciani, W., Abalo, M. *et al.* (2016) Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific Reports*;6:28084. doi: 10.1038/srep28084

Regato, P. (2008) Adaptación al cambio global. Los bosques mediterráneos. Málaga: UICN Centro de Cooperación del Mediterráneo.

Reilly, T.J., Chance, D.L., Calcutt, M.J., Tanner, J.J., Felts, R.L., Waller, S.C. *et al.* (2009) Characterization of a Unique Class C Acid Phosphatase from *Clostridium perfringens*. *Applied Environmental Microbiology*;75:3745-3754.

Reintjes, G., Arnosti, C., Fuchs, B.M., y Amman, R. (2017) An alternative polysaccharide uptake mechanism of marine bacteria. *The ISME Journal*;11:1640-1650.

Richter, M. y Rosselló-Móra, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;106:19126-19131.

Rigaud, J. y Puppo, A. (1975) Indole-3 acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *Journal of General Microbiology*;88:223-228.

Rincón, A., Ruiz-Díez, B., García-Fraile, S., Lucas García, J.A., Fernández-Pascual, M., Pueyo, J.J. *et al.* (2005) Colonisation of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *FEMS Microbiology Ecology*;51:303-311.

Rincón, A., Valladares, F., Gimeno, T.E. y Pueyo, J.J. (2008) Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiology*;28:1693-1701.

Rivas, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., Martínez Molina, E. y Velázquez, E. (2006) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. *Plant and Soil*;287:23-33.

Robin, C., Smith, I. y Hansen E.M. (2012) *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Phytophthoras*;2. doi:10.5399/osu/fp.2.1.3041.

Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J.I., Velázquez, E., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Ramírez-Bahena, M.H. *et al.* (2008) *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;105:7064-7069.

Robles-Cruz, A.B. (2004) Las áreas pasto-cortafuego como medida preventiva contra incendios. En: Simón Navarrete, E., Ripoll Morales, M.A. y González Rebollar, J.L. (Eds.) *Forestación en paisajes agrarios*. Sevilla: Servicio de Publicaciones y Divulgación de la Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.

Robles Cruz, A.B., Ramos Font, M.E., Tognetti Barbieri, M., Fernández López, M., Sandalio González, M.L., Villadas Latorre, P. *et al.* Investigaciones sobre la flora forrajera natural en mejoras de pastos, restauración forestal, y silvicultura preventiva con ganado: Una experiencia piloto en Sierra Nevada. (Sometido, Organismo Autónomo de Parques Nacionales).

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. y Bashan, Y. (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*;287:15-21.

Rogel, M.A., Hernández-Lucas, I., Kuykendall, L.D., Balkwill, D.L. y Martínez-Romero, E. (2001) Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* Harboring *Rhizobium tropici* symbiotic Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*;67:3264-3268.

Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E. y Martínez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*;34:96-104.

Romanowicz, K.J., Freedman, Z.B., Upchurch, R.A., Argiroff, W.A. y Zak, D.R. (2016) Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: the influence of pH and soil moisture. *FEMS Microbiology Ecology*;92:fiw149. doi: 10.1093/femsec/fiw149

Román-Ponce, B., Zhang, Y.J., Vásquez-Murrieta, M.S., Sui, X.H., Chen, W.F., Padilla, C.A.J. *et al.* (2016) *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;66:398-406.

Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Sánchez, M.E. y Trapero, A. (2005) Estado fitosanitario de los montes andaluces: enfermedades de los *Quercus* en Andalucía. IV Congreso Forestal Español. Sección 04 Zaragoza, 26-30 septiembre de 2005.

Rosselló-Mora, R., Urdiain, M. y López-López, A. (2011) DNA-DNA Hybridization. En: Rainey, F. y Oren, A. (Eds.) *Methods in Microbiology*. Cambridge: Academic Press Impression.

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G. *et al.* (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*;4:1340-1351.

Ruiz de la Torre, J. y Ceballos, L. (1979) *Árboles y arbustos*. Madrid: Escuela Técnica y Superior de Ingeniería de Montes.

Ruiz Mirazo, J. (2011) Las áreas pasto-cortafuegos: un sistema silvopastoral para la prevención de incendios forestales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Ruiz-Mirazo, J., Robles, A.B., González-Rebollar, J.L. (2011) Two year evaluation of fuelbreaks grazed by livestock in the wildfire prevention program in Andalusia (Spain). *Agriculture Ecosystems and Environment*;14:13-22.

Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon J., Hatakka, A., de Vries, R.P. y Mäkelä, M.R. (2014) Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*;78:614-649.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. *et al.* (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;100:4927-4932.

Sadava, D., Heller, H.G., Orians, G.H., Purves, W.K. y Hillis, D.M. (2009) *Vida, la ciencia de la biología*. (8ª ed.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Saïdi, S., Ramírez-Bahena, M.H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A. *et al.* (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;64:242-247.

Saitou, N. y Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*;4:406-425.

Saleem, M., Zamir, M.S.I., Haq, I., Irshad, M.Z., Khan, M.K., Asim, M. *et al.* (2015) Yield and quality of forage oak (*Avena sativa* L.) cultivars as affected by seed inoculation with nitrogenous strains. *American Journal of Plant Sciences*;6:3251-3259.

Salomón Moreno, R.L. (2015) *Unearthing the roots of degradation of Quercus pyrenaica* coppices: an integrative perspective from clonal structure to carbon budgets. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Sambrook, J.f., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2ª ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santillana, N., Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Velázquez, E. y Zúñiga, D. (2008) Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Archives of Microbiology*;189:239-247.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C., y Glick, B.R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*;183:92-99.

Sarma, B.K., Yadav, S.K., Singh, S. y Singh, H.B. (2015) Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*;87:25-33.

Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z.A., Nadeem, S.M., Yaseen, M. *et al.* (2019) Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Applied Soil Ecology*;133:146-159.

Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., *et al.* (2011). BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Research*;39:670-676.

Schloss, P.D., Gevers, D. y Westcott, S.L. (2011) Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE*;6:e27310. doi: 10.1371/journal.pone.0027310

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-

supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*;75:7537-7541.

Schoonbeek, H.J., Jacquat-Bovet, A.C., Mascher, F. y Métraux, J.P. (2007) Oxalate-Degrading Bacteria Can Protect *Arabidopsis thaliana* and Crop Plants Against *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;20:1535-1544.

Schwieger, F. y Tebbe, C.C. (2000) Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*)—Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to the Diversity of Cultivated Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*;66:3556-3565.

Schwyn, B. y Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*;160:47-56.

Segovia, L., Young, J.P.W. y Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar Phaseoli Type I Strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*;43:374-377.

Sepahy, A.A., y Jabalameli, L. (2011) Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Protease by *Bacillus* sp. Isolated from Soil Sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme Research*;2011:219628. doi:10.4061/2011/219628

Serrada Hierro, R., Aroca Fernández, M.J., Roig Gómez, S., Bravo Fernández, A. y Gómez Sanz, V. (2011) Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático en el sector forestal. Notas sobre gestión adaptativa de las masas forestales ante el cambio climático. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z.K., Gunter, L., Labbé, J. *et al.* (2013) A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees. *PLoS ONE*;8:e76382. doi: 10.1371/journal.pone.0076382

Shamseldin, A., Carro, L., Peix, A., Velázquez, E., Moawad, H. y Sadowsky, M.J. (2016) The symbiovar trifolii of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt. *Systematic and Applied Microbiology*;39:275-279.

Shannon, C.E. y Weaver, W. (1949) The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press.

Sharma, R., Pal, J. y Kaur, M. (2017) Isolation of phosphate solubilizing *Pseudomonas* strains from apple rhizosphere in the Trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/193672>

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. y Gobi, T.A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*;2:587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587

Shindu, S.S., Rakshiya, Y.S. y Sahu, G. (2008) Biological Control of Soilborne Plant Pathogens with Rhizosphere Bacteria. *Pest Technology*;3:10-21.

Shu, Z., Lin, H., Shi, S., Mu, X., Liu, Y. y Huang, J. (2016) Cell-bound lipases from *Burkholderia* sp. ZYB002: gene sequence analysis, expression, enzymatic characterization and 3D structural model. *BMC Biotechnology*;16:38. doi: 10.1186/s12896-016-0269-6

Sigurbjörnsdóttir, M.A. y Vilhelmsson, O. (2016) Selective isolation of potentially phosphate-mobilizing, biosurfactant-producing and biodegradative bacteria associated with a sub-Arctic, terricolous lichen, *Peltigera membranacea*. *FEMS Microbiology Ecology*;92:fiw90. doi: 10.1093/femsec/fiw090

Sikora, R. (1988) Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*;40:867-878.

Simonetti, E., Roberts, I.N., Montecchia, M.S., Gutierrez-Boem, F.H., Gomez, F.M. y Ruiz, J.A. (2018) A novel *Burkholderia ambifaria* strain able to degrade the mycotoxin fusaric acid and to inhibit *Fusarium* spp. growth. *Microbiological Research*;206:50-59.

Simpson, E.H., (1949). Measurement of Diversity. *Nature*;163:688. doi: 10.1038/163688a0

Sindhu, S.S. y Dadarwal, K.R. (2001) Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea. *Microbiological Research*;156:353-358.

Singh, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S. y Singh, H.B. (2013) Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research*;168:33-40.

Singh, R.P., Shelke, G.M., Kumar, A. y Jha, P.N. (2015) Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in Microbiology*;6:937. doi:10.3389/fmicb.2015.00937

Smith, S.E. y Read, D.J. (2000) Mycorrhizal symbiosis. (2^a ed.) New York: Academic Press.

Smithwick, E.A.H., Turner, M.G., Metzger, K.L. y Balsern T.C. (2005) Variation in NH₄⁺ mineralization and microbial communities with stand age in lodgepole pine (*Pinus contorta*) forests, Yellowstone National Park (USA). *Soil Biology and Biochemistry*;37:1546-1559.

Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valáškov, V., Merhautová, V., Petranková, M., Spetz, P. *et al.* (2011) Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology*;75:291-303.

Sokal R.R. y Michener C.D (1958) A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *University of Kansas Science Bulletin*;38:1409-1438.

Sokolova, M., Akimova, G. y Vaishlya, O. (2011) Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*;47:274-278.

Sousa, N.R., Franco, A.R., Ramos, M.A., Oliveira, R.S. y Castro, P.M.L. (2015) The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering*;81:439-443.

Spaepen, S. y Vanderleyden, J. (2011) Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*;3:a001438. doi: 10.1101/cshperspect.a001438

Stackebrandt, E. y Goebel, B.M. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA–DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*;44:846-849.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J. *et al.* (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;52:1043-1047.

Stanghellini, M.E. y Miller, R.M. (1997) Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. *Plant Disease*;81:4-12.

Steenkamp, E.T., Stępkowski, T., Przymusiak, A., Botha, W.J. y Law, I.J. (2008) Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*;48:1131-1144.

Steinberger, R. y Holden, P. (2005) Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*;71:5404-5410.

Sterkenburg, E., Bahr, A., Brandström Durling, M., Clemmensen, K.E. y Lindahl, B.D. (2015) Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. *The New Phytologist*;207:1145-1158.

Steven, B., Hesse, C., Soghigian, J., Gallegos-Graves, L.V. y Dunbar, J. (2017) Simulated rRNA/DNA Ratios Show Potential To Misclassify Active Populations as Dormant. *Applied and Environmental Microbiology*;83:e00696-17 doi: 10.1128/AEM.00696-17

Stewart, E.J. (2012) Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*;194:4151-4160.

Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R.K. y Schmidt, T.M. (2015) *rrnDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*;43:593-598.

Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M.B., Burgess, R. y Baldrian, P. (2012) Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiology Ecology*;80:735-746.

- Subbarayan, P.R. y Sarkar, M. (2004) A comparative study of variation in codon 33 of the *rpoS* gene in *Escherichia coli* K12 stocks: implications for the synthesis of σ^s . *Molecular Genetics and Genomics*;270:533-538.
- Suen, G., Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Aylward, F.O., Boyum, J., Deneke, J. *et al.* (2011) The Complete Genome Sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 Reveals a Cellulolytic and Metabolic Specialist. *PLoS ONE*;6:e18814. doi: 10.1371/journal.pone.0018814
- Sundseth, K. (2010) Natura 2000 en la región mediterránea. Luxemburgo: Comisión Europea Dirección de Medio Ambiente. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.
- Suominen, L., Roos, C., Lortet, G., Paulin, L. y Lindstroem, K. (2001) Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer. *Molecular Biology and Evolution*;18:907-916.
- Suzuki, M.T. y Giovannoni, S.J. (1996) Bias Caused by Template Annealing in Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*;62:625-630.
- Syed-Ab-Rahman, S.F., Carvalhais, L.C., Chua, E., Xiao, Y., Wass, T.J. y Schenk, P.M. (2018) Identification of Soil Bacterial Isolates Suppressing Different *Phytophthora* spp. and Promoting Plant Growth. *Frontiers in Plant Science*;9:1502. doi: 10.3389/fpls.2018.01502
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Khan, M.S.I., Shahid, N. *et al.* (2017) Bottlenecks in commercialization and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*;121:102-117.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*;28:2731-2739.
- Tayeb, L.A., Ageron, E., Grimont, F. y Grimont, P.A.D. (2005) Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*;156:763-777.
- Thais, K.R., Dheilly, N.M., Klassen, J.L., Brucker, R.M., Baines, J.F., Bosch, T.C.G. *et al.* (2016) Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbes. *Microbial Systems*;1:e00028-16. doi: 10.1128/mSystems.00028-16
- Thavaud, P. (2006) Dispositif agroenvironnemental appliqué à la prévention des incendies de forêt en région méditerranéenne. Résultats de 20 ans de réalisations et propositions pour l'avenir. Document de synthèse. Réseau coupures de combustible. Laudun: La Cardère-l'Éphémère.
- Thompson, I.P., Cook, K.A., Lethbridge, G. y Burns, R.G. (1990) Survival of two ecologically distinct bacteria (*Flavobacterium* and *Arthrobacter*) in unplanted and rhizosphere soil: laboratory studies. *Soil Biology and Biochemistry*;22:1029-1037.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*;25:4876-4882.

Tian, J.H., Pourcher, A.M., Bouchez, T., Gelhaye, E. y Peu, P. (2014) Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Applied Microbiology and Biotechnology*;98:9527-9544.

Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.T., Gu, J.G. *et al.* (2008) *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;58:2871-2875.

Tindall, B.J., Rosselló-Mora, R., Busse, H.J., Ludwig, W. y Kämpfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;60:249-266.

Toju, H., Peay, K.G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K. *et al.* (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*;4:247-257.

Tong, W., Li, X., Huo, Y., Zhang, L., Cao, Y., Wang, E. *et al.* (2018) Genomic insight into the taxonomy of *Rhizobium* genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Systematic and Applied Microbiology*;41:300-310.

Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A. y Bandler. (1998) Yeast, Molds and Mycotoxins. En: Food and Drug Administration. (Ed.) *Bacteriological Analytical Manual*. (8ª ed.) Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam#intro> [Consultado: 13-07-2017]

Traving, S.J., Thygesen, U.H., Riemann, L. y Stedmon, C. (2015) A Model of Extracellular Enzymes in Free-Living Microbes: Which Strategy Pays Off? *Applied and Environmental Microbiology*;81:7385-7393

Tripathi, R.K. y Gottlieb, D. (1969) Mechanism of Action of the Antifungal Antibiotic Pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology*;100:310-318.

Turan, M., Ekinci, M., Yildirim., E., Güneş, A., Karagöz, K., Kotan, R. *et al.* (2014) Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*;38:327-333.

Ulzen, J., Abaidoo, R.C., Masso, C., Owusu-Ansah, E.D.J. y Ewusi-Mensah, N. (2018) Is there a need for *Bradyrhizobium yuanmingense* and *B. japonicum* reinoculation in subsequent cropping seasons under smallholder farmers' conditions? *Applied Soil Ecology*;128:54-60.

UNESCO. (2019a) Global Change in Mountains Regions (GLOCHAMORE). Disponible en: <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/ecological-sciences/specific-ecosystems/mountains/glochamore/> [Consultado: 14-06-2019]

UNESCO. (2019b) Cambio Climático Global en los sitios de montaña (GLOCHAMOST). Disponible en <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/ecological-sciences/specific-ecosystems/mountains/glochamost/>

sciences/environment/ecological-sciences/specific-ecosystems/mountains/glochamost/
[Consultado: 14-06-2019]

Uren, N.C. (2007) Types, ammounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. En: Pinton, R., Varanini, Z. y Nannipieri, P. (Eds.) *The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (2ª ed.) Boca Raton: CRC Press.

Uroz, S., Buée, M., Deveau, A., Mieszkin, S. y Martin, F. (2016) Ecology of the forest microbiome: Highlights of temperate and boreal ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*;103:471-488.

Uroz, S., Blueé, M., Murat, C., Frey-Klett, P. y Martin, F. (2010) Pyrosequencing reveals a constreated bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*;2:281-288.

Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P. y Frey-Klett, P. (2009) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*;17:378-387.

Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Pierrat, J.C., Mustin, C. y Frey-Klett, P. (2007) Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology*;73:3019-3027.

Uroz, S., Courty, P.E., Pierrat, J.C., Peter, M., Buée, M., Turpault, M.P. *et al.* (2013) Functional Profiling and Distribution of the Forest Soil Bacterial Communities Along the Soil Mycorrhizosphere Continuum. *Microbial Ecology*;66:404-415.

Valášková, V. y Baldrian, P. (2006) Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*;157:119-124.

Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E. y Velázquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov., a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;56:2631-2637.

Van Cauwenberghe, J., Verstraete, B., Lemaire, B., Lievens, B., Michiels, J. y Honnay, O. (2014) Population estructure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. *Systematic and Applied Microbiology*;37:613-621.

van den Brink, J. y de Vries, R.P. (2011) Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*;91:1477-1492.

van der Heijden, M.G.A. y Hartmann, M. (2016) Networking in the Plant Microbiome. *PLoS ONE*;14:e1002378. doi: 10.1371/journal.pbio.1002378

van der Wal, A., Geydan, T.D., Kuyper, W.D. y de Boer, W. (2013) A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiology Reviews*;37:477-494.

Van Dyk, J.S. y Pletschke, B.I. (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*;30:1458-1480.

van Loon, L.C., Bakker, P.A. y Pieterse, C.M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*;36:453-483.

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. y Dufresne, A. (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *The New Phytologist*;206:1196-1206.

VanInsberghe, D., Maas, K.R., Cardenas, E., Strachan, C.R., Hallam, S.J. y Mohn, W.W. (2015) Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *The ISME Journal*;9:2435-2441.

Vaz Patto, M.C. y Rubiales, D. (2014). *Lathyrus* diversity: available resources with relevance to crop improvements – *L. sativus* and *L. cicera* as case studies. *Annals of Botany*;113:895-908.

Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M.H., Rivas, R. y Martínez-Molina, E. (2010) Bacteria Involved in Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis: Current Taxonomic Perspective. En: Khan, M.S., Musarrat, J. y Zaidi, A. (Eds.) *Microbes for Legume Improvement*. Viena: Springer-Verlag.

Verastegui, Y., Cheng, J., Engel, K., Kolczynski, D., Mortimer, S., Lavigne, J. *et al.* (2014) Multisubstrate Isotope Labeling and Metagenomic Analysis of Active Soil Bacterial Communities. *MBio*;5:e01557-14. doi: 10.1128/mBio.01157-14

Vericat, P. y Piqué, M. (2012) *Quercus* mediterráneos, cambio global y gestión forestal. En: Vericat, P., Piqué, M. y Serrada, R. (Eds.) *Gestión adaptativa al cambio global en masas de Quercus mediterráneos*. Lleida: Centre Tecnològic Forestal de Catalunya.

Větrovský, T., Baldrian, P. y Morais, D. (2018) SEED 2: a user friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*;34:2292-2294.

Větrovský, T., Steffen, K.T. y Baldrian, P. (2014) Potential of Cometary Transformation of Polysaccharides and Lignin in Lignocellulose by Soil *Actinobacteria*. *PLoS ONE*;9:e89108. doi: 10.1371/journal.pone.0089108

Vilches de la Serna, P.B. (2014) Estudio integral de los bosques de *Quercus pyrenaica* Willd. en la Península Ibérica: características bioclimáticas, sintaxonómicas y especies indicadoras. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Villadas, P.J., Lasa, A.V., Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J.D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E. *et al.* (2017) Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology*;40:92-101.

Vincent, J.M. (1970) *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. y Martínez-Romero, E. (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*;34:29-54.
- Vodovnik, M., Duncan, S.H., Reid, M.D., Cantla, L., Turner, K., Parkhill, J. *et al.* (2013) Expression of cellulosome components and Type IV Pili within the Extracellular Proteome of *Ruminococcus flavefaciens* 007. *PLoS ONE*;8:e65333. doi: 10.1371/journal.pone.0065333
- von Neubeck, M., Huptas, C., Glück, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Streeter, T. *et al.* (2017) *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;67:1656-1664.
- Vonderwell, J.D. y Enebak, S.A. (2000) Differential effects of rhizobacterial strain and dose and the ectomycorrhizal colonization of loblolly pine seedlings. *Forest Sciences*;46:411-437.
- Voříšková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T. y Baldrian, P. (2014) Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak soil. *The New Phytologist*;201:269-278.
- Vrba, J., Nedoma, J., Šimek, K. y Seda, J. (1992) Microbial decomposition of polymeric organic matter related to plankton development in a reservoir: activity of α -, β -glucosidase, and β -*N*-acetylglucosaminidase and uptake of *N*-acetylglucosamine. *Archiv für Hydrobiologie*;126:193-211.
- Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F. y van der Heijden, M.G.A. (2014) Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;111:5266-5270.
- Wagner, S.C. (2011) Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*. Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/> [Consultado: 04-07-2014].
- Wagner, B.D., Robertson, C.E. y Harris, J.K. (2011) Application Of Two-Part Statistics for Comparison of Sequence Variant Counts. *PLoS ONE* 6:e20296. doi: 10.1371/journal.pone.0020296
- Walker, M.J., Birch, R.G. y Pemberton, J.M. (1988) Cloning and characterization of an albicidin resistance gene from *Klebsiella oxytoca*. *Molecular Microbiology*;2:443-454.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P. y O'Gara, F. (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*;12:289-295.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. y Cole, J.R. (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*;73:5261-5267.

Bibliografía

Wang, J., Li, Q., Xu, S., Zhao, W., Lei, Y., Song, C. *et al.* (2018) Tratis-Based Integrations of Multi-Species Inoculants Facilitates Shifts of Indigenous Soil Bacterial Community. *Frontiers in Microbiology*;9:1692. doi: 10.3389/fmicb.2018.01692

Wang, L., Wang, G.L., Li, S.P. y Jiang, J.D. (2011) *Luteibacter jiangsuensis* sp. nov.: A Methamidophos-Degrading Bacterium Isolated from a Methamidophos-Manufacturing Factory. *Current Microbiology*;62:289-295.

Warnes, G.R, Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W.H.A., Lumley, T. *et al.* (2019) gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. R package version 3.0.1.1. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=gplots>

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I. *et al.* (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*;37:463-464.

Wegst, W. y Lingens, F. (1983) Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters*;17:341-344.

Wei, Z., Hu, X., Li, X., Zhang, Y., Jiang, L., Li, J. *et al.* (2017) The rhizospheric microbial community structure and diversity of deciduous and evergreen forests in Taihu Lake area, China. *PLoS ONE*;12:e0174411. doi: 10.1371/journal.pone.0174411

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*;173:697-703.

Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., González, A. *et al.* (2017) Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*;5:27. doi: 10.1186/s40168-017-0237-y

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.M.M. y Tomashow, L.S. (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*;40:309-348.

Whelan, R.J. (1995) *The Ecology of Fire*. Cambridge: Cambridge University Press.

White, C., Tardif, J.C., Adkins, A. y Staniforth, R. (2005) Functional diversity of microbial communities in the mixed boreal plain forest of central Canada. *Soil Biology and Biochemistry*;37:1359-1372.

Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag.

Wilhem, L., Besemer, K., Fasching, C., Urich, T., Singer, G.A., Quince, C. y Battin, T.J. (2014) Rare but active taxa contribute to community dynamics of benthic biofilms in glacier-fed streams. *Environmental Microbiology*;16:2514-2524.

Willard, H.H., Merrit, L.L., Dean, J.A., (1974) *Instrumental Methods of Analysis*. (5ª ed.) New York: Van Nostrand.

Wu, M., Wen, J., Chang, M., Yang, G. y Zhou, S., 2014. *Pseudomonas sihuiensis* sp. nov., isolated from a forest soil in South China. *Antonie Van Leeuwenhoek*;105:781-790.

Xie, H., Pasternak, J.J. y Glick, B.R. (1996) Isolation and Characterization of Mutants of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 That Overproduce Indoleacetic Acid. *Current Microbiology*;32:67-71.

Yamamoto, S. y Harayama, S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*;61:1104-1109.

Yang, Z. (1994) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*;39:306-314.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. *et al.* (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;67:1613-1617.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;51:89-103.

Zahir, Z.A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S.M., y Asghar, H.N. (2009) Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Archives of Microbiology*;191:415-424.

Zamora, R. y Barea-Azcón, J.M. (2015) Long-Term Changes in Mountain Passerine Bird Communities in the Sierra Nevada (Southern Spain): A 30-year Case Study. *Ardeola*;62:3-18.

Zamora, R., Pérez-Luque, A.J., Bonet, F.J., Barea-Azcón, J.M. y Aspizua, R. (2015) La huella del cambio global en Sierra Nevada: Retos para la conservación. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.

Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S. *et al.* (2015) The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*;6:e02527. doi: 10.1128/mBio.02527-14

Zevenhuizenf, L.P.T.M. y Bartnicki-Garcia, S. (1969) Chemical Structure of the Insoluble Hyphal Wall Glucan of *Phytophthora cinnamomi*. *Biochemistry*;8:1496-1502.

Zhang, L. y Birch, R.G. (1997) The gene for albidicin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*

Bibliografía

to sugarcane. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America;94:9984-9989.

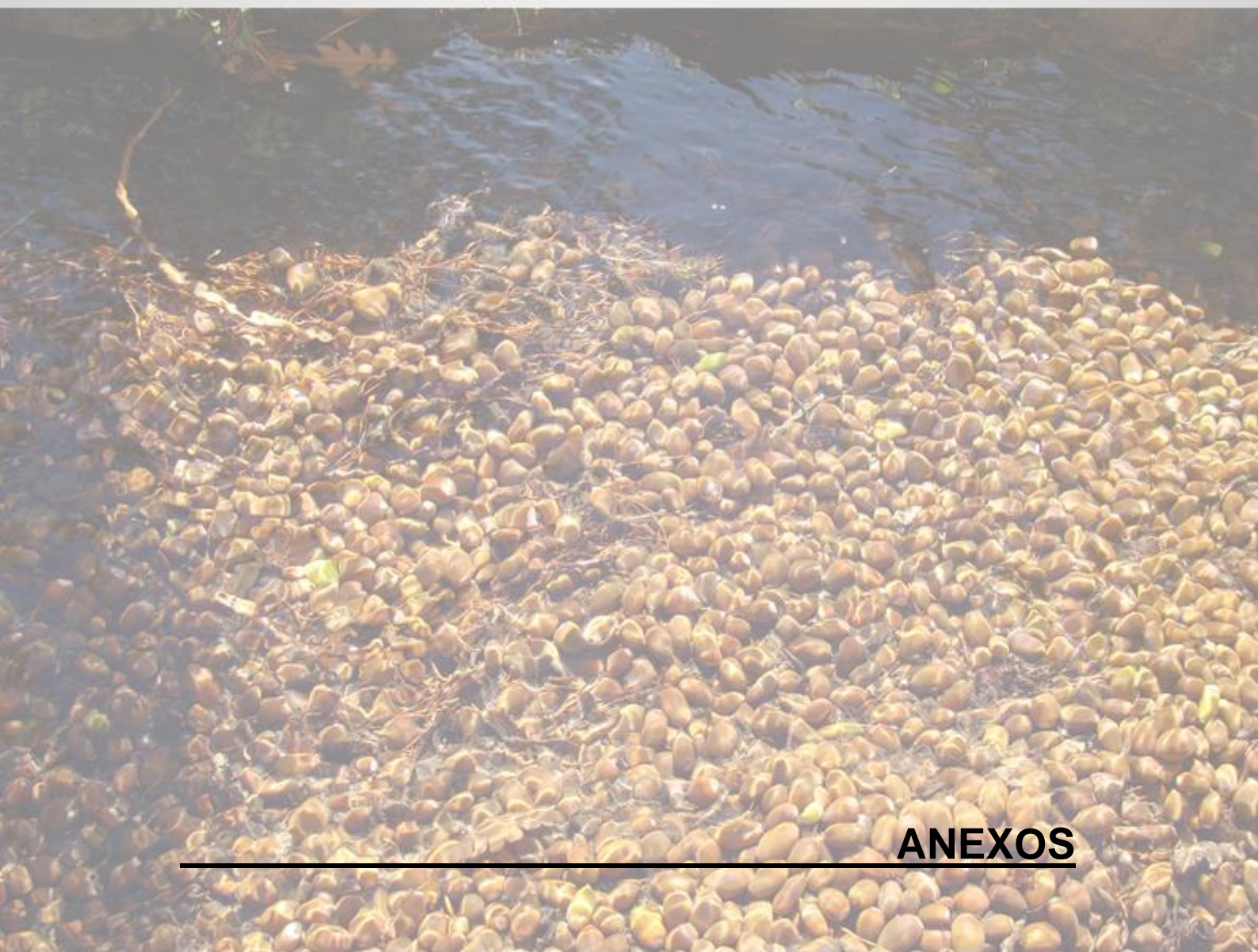
Zhang, W., Yang, K., Lyu, Z. y Zhu, J. (2019) Microbial groups and their functions control the decomposition of coniferous litter: A comparison with broadleaved tree litters. *Soil Biology and Biochemistry*;133:196-207.

Zhang, Y.J., Zheng, W.T., Overall, I., Young, J.P., Zhang, X.X., Tian, C.F. *et al.* (2015) *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;65:2960-2967.

Zhou, Y.J., Li, J.H., Friedman, C.R. y Wang, H.F. (2017) Variation of Soil Bacterial Communities in a Chronosequence of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Plantations. *Frontiers in Plant Sciences*;8:849. doi: 10.3389/fpls.2017.00849

Žifčáková, L., Větrovský, T., Howe, A. y Baldrian, P. (2016) Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology*;18:288-301.

101º Congreso de los Estados Unidos (1990) “Ley Pública 101-606: The U.S. Global Change Research Act of 1990” *Stat. 16 de noviembre de 1990* (104), pp. 3096-3104.



ANEXOS

La imagen muestra bellotas de *Quercus pyrenaica* sumergidas en el agua de un río.

Fuente: Dr. D. Manuel Fernández López.

Tabla A.1. Principales funciones de R empleadas para el análisis estadístico y representación gráfica de los datos en estudio. Únicamente se indican las funciones esenciales empleadas, omitiendo todas aquellas secundarias y los argumentos específicos de cada una de ellas. Las funciones no pertenecientes a ningún paquete externo (*funciones base*) corresponden a aquellas incluidas en el propio software R.

Función	Paquete de pertenencia	Utilidad	Referencia
Análisis ecológico de comunidades microbianas			
<i>adonis()</i>	vegan	Realizar el test no paramétrico permutacional PERMANOVA	Oksanen <i>et al.</i> (2016)
<i>anova.cca()</i>	vegan	Test de permutaciones tipo ANOVA, para CCA, RDA o CAP	Oksanen <i>et al.</i> (2016)
<i>betadisper()</i>	vegan	Realizar el test PERMDISP	Oksanen <i>et al.</i> (2016)
<i>dist()</i>	base	Calcular una matriz de distancia entre las filas de una matriz de datos, en base a una medida de distancia especificada	R Development Core Team (2016)
<i>distance()</i>	phyloseq	Calcular distancias y disimilaridades entre parejas de muestras, a partir de un objeto <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
<i>estimate_richness()</i>	phyloseq	Calcular índices alfa a partir de un objeto <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
<i>hclust</i>	base	Realizar análisis de <i>clustering</i> jerárquico aglomerativo a partir de matrices de distancia	R Development Core Team (2016)
<i>import_biom()</i>	phyloseq	Introducir datos en formato biom para crear objetos de tipo <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
<i>import_qiime_sample_data()</i>	phyloseq	Importar metadatos generados mediante Qiime. Válido también para tablas de metadatos creadas con editores de texto simples	McMurdie y Holmes (2013)
<i>merge_phyloseq()</i>	phyloseq	Crear un objeto <i>phyloseq</i> a partir de sus componentes (tabla de OTUs, tabla de metadatos y tabla de taxonomía)	McMurdie y Holmes (2013)
<i>ordinate()</i>	phyloseq	Obtener una ordenación multivariante a partir de un objeto <i>phyloseq</i> , teniendo en cuenta el método de ordenación y medida de distancia deseados	McMurdie y Holmes (2013)
<i>otu_table()</i>	phyloseq	Crear, acceder o asignar una tabla de OTUs	McMurdie y Holmes (2013)
<i>pairwise.adonis()</i>	pairwiseAdonis	Realizar el test PERMANOVA por parejas, es decir, para realizar comparaciones dos a dos en el caso de factores con múltiples niveles	Martinez-Arbizu (2017)
<i>permutest()</i>	vegan	Realización de test de permutaciones similar a ANOVA	Oksanen <i>et al.</i> (2016)
<i>prune_taxa()</i>	phyloseq	Eliminar taxones concretos de un objeto <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
<i>rarecurve()</i>	vegan	Obtener curvas de rarefacción	Oksanen <i>et al.</i> (2016)

Anexos

rarefy_even_depth()	phyloseq	Realizar la rarefacción de las muestras en base al número de secuencias deseado	McMurdie y Holmes (2013)
read.tree()	ape	Importar a R un archivo que contiene un árbol filogenético	Paradis y Schliep (2018)
read_biom()	biomformat	Importar datos en formato biom a R	McMurdie y Paulson (2016)
root()	ape	Enraizar un árbol filogenético	Paradis y Schliep (2018)
sample_data()	phyloseq	Crear, acceder o asignar una tabla de metadatos	McMurdie y Holmes (2013)
scores()	vegan	Acceso al <i>score</i> o puntuación de las muestras en estudio en los ejes concretos de los gráficos de ordenación	Oksanen <i>et al.</i> (2016)
subset_samples()	phyloseq	Extraer muestras concretas en base a la tabla de metadatos incluida en el objeto <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
subset_taxa()	phyloseq	Extraer taxones concretos en base a la tabla de taxonomía incluida en el objeto <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
tax_glom()	phyloseq	Unir, aglomerar OTUs al 3% de distancia con la misma taxonomía en un rango taxonómico superior	McMurdie y Holmes (2013)
tax_table()	phyloseq	Crear, acceder o asignar una tabla con la taxonomía de los OTUs	McMurdie y Holmes (2013)
transform_sample_counts()	phyloseq	Transformar datos de abundancia de una tabla de OTUs	McMurdie y Holmes (2013)
UniFrac()	phyloseq	Calcular distancias UniFrac entre parejas de muestras, a partir de un objeto <i>phyloseq</i>	McMurdie y Holmes (2013)
vif.cca()	vegan	Calcular los factores de inflación de la varianza (VIF) para la detección de colinealidad entre variables ambientales	Oksanen <i>et al.</i> (2016)
Análisis estadístico univariante y de variables bidimensionales			
anova()	base	Realizar el test ANOVA de una vía sobre un objeto de tipo modelo previamente ajustado	R Development Core Team (2016)
cor.test()	base	Realizar el test de correlaciones de variables bidimensionales. Calcula diferentes coeficientes de correlación (Pearson, Spearman, Kendall)	R Development Core Team (2016)
dunn.test()	dunn.test	Realizar el test no-paramétrico de Dunn para comparaciones múltiples	Dinno (2017)
glht()	multcomp	Comparar múltiples grupos para modelos paramétricos, incluyendo los contrastes <i>post-hoc</i> . Es necesario introducir un modelo ajustado previamente, por ejemplo el obtenido mediante <i>anova()</i>	Hothorn <i>et al.</i> , (2008)

<i>HSD.test()</i>	agricolae	Realizar el test <i>post-hoc</i> de diferencias honestamente significativas de Tukey para comparaciones múltiples	de Mendiburu (2017)
<i>kruskal.test()</i>	base	Realizar el test de Kruskal-Wallis no paramétrico para la comparación de medias de una variable entre tres o más grupos	R Development Core Team (2016)
<i>leveneTest()</i>	car	Realizar el test de Levene para estudiar la homogeneidad de la varianza de diferentes grupos	Fox y Weisberg (2011)
<i>lm()</i>	base	Ajustar un modelo lineal de la variable dependiente y el factor a analizar, sobre el que realizar ANOVA	R Development Core Team (2016)
<i>shapiro.test()</i>	base	Realizar el test de normalidad de Shapiro-Wilk para variables unidimensionales	R Development Core Team (2016)
<i>t.test()</i>	base	Realizar el test de Student para la comparación de medias de dos grupos de distribución normal y homocedáticas	R Development Core Team (2016)
<i>wilcox.test()</i>	base	Realizar el test de Wilcoxon o U de Mann-Whitney no paramétrico para la comparación de dos grupos	R Development Core Team (2016)
Representaciones gráficas			
<i>draw.pairwise.venn()</i>	VennDiagram	Obtener un diagrama de Venn de dos vías	Chenn y Boutros (2011)
<i>geom_bar()</i>	ggplot2	Dibujar diagramas de barras	Wickham (2016)
<i>geom_boxplot()</i>	ggplot2	Dibujar diagramas <i>box-plot</i> (caja y bigotes) en el estilo de representación de Tukey	Wickham (2016)
<i>geom_histogram()</i>	ggplot2	Visualizar la distribución de una variable continua mediante histogramas	Wickham (2016)
<i>geom_point()</i>	ggplot2	Representar gráficamente diagramas de dispersión	Wickham (2016)
<i>geom_segment()</i>	ggplot2	Dibujar líneas rectas entre puntos	Wickham (2016)
<i>grid.arrange()</i>	gridExtra	Obtener varios paneles en una misma figura	Auguie (2017)
<i>heatmap.2()</i>	gplots	Construir <i>heatmaps</i> con uno o varios dendrogramas acoplados	Warnes <i>et al.</i> , 2019
<i>plot()</i>	base	Obtener gráficos básicos a partir de objetos de R. Los atributos gráficos pueden mejorarse con el argumento <i>par</i>	R Development Core Team (2016)
<i>plot_ordination()</i>	phyloseq	Obtener el gráfico de ordenación multivariante en base al paquete ggplot2	McMurdie y Holmes (2013)

Tabla A.2. Número de acceso de las cepas tipo del género *Pseudomonas* en las bases de datos EzTaxon y GenBank® donde se encuentran depositadas las secuencias de los genes *rrs* y *rpoD* analizadas, respectivamente.

Cepa tipo	Número de acceso (gen <i>rrs</i> , gen <i>rpoD</i>)
<i>P. helmanticensis</i> OHA11 ^T	HG940537, HG940517
<i>P. kribbensis</i> 46-2 ^T	KT321658, KR709086
<i>P. granadensis</i> F-278770 ^T	HG764748, HG764748
<i>P. baetica</i> a390 ^T	FM201274, FN678357
<i>P. prosekii</i> AN/28/1 ^T	JN814372, NZ_LT629762
<i>P. migulae</i> NBRC 103157 ^T	NR_114223, FN554486
<i>P. mandelii</i> NBRC 103147 ^T	NR_114216, FN554482
<i>P. arsenicoxydans</i> VC1 ^T	FN645213, NZ_LT629705
<i>P. deceptionensis</i> M1 ^T	GU936597, JYKX01000005
<i>P. versuta</i> L10.10 ^T	KX714290, KY264773
<i>P. weihenstephanensis</i> DSM 29166 ^T	KP738720, KP738727
<i>P. endophytica</i> BSTT44 ^T	LN624760, LN624763
<i>P. helleri</i> DSM 29165 ^T	KP738715, KP738722
<i>P. extremaustralis</i> CT14-3 ^T	AJ583501, HE800479
<i>P. yamanorum</i> 8H1 ^T	EU557337, JX987895
<i>P. canadensis</i> 2-92 ^T	HQ403142, NZ_AYTD01000017
<i>P. fluorescens</i> IAM 12022 ^T	D84013, D86033.
<i>P. paralactis</i> DSM 29164 ^T	KP756921, KP756915
<i>P. lactis</i> DSM 29167 ^T	KP756923, JYLN01000003
<i>P. protegens</i> CHA0 ^T	AJ278812, NC_021237
<i>P. saponiphila</i> DSM 9751 ^T	FM208264, NZ_FNTJ01000001
<i>P. batumici</i> UCM B-321 ^T	JXDG0100010, JXDG01000003
<i>P. syringae</i> NCPPB 281 ^T	DQ318866, JX867790
<i>P. graminis</i> DSM 11363 ^T	NR_026395, NZ_FOHW01000007
<i>P. lutea</i> OK2 ^T	AY364537, FN554480
<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T	FN554447, FN554447
<i>P. rhizosphaerae</i> IH5 ^T	NR_029063, FN554510
<i>P. donghuensis</i> HYS ^T	NR_136501, NZ_JH650758
<i>P. alkylphenolica</i> KL28 ^T	NR_145644, NZ_CP009048
<i>P. putida</i> IAM 1236 ^T	D84020, AB039581
<i>P. guariconensis</i> PCAVU11 ^T	HF674459, HF674460
<i>P. taiwanensis</i> BCRC 17751 ^T	EU103629, HE577796
<i>P. entomophila</i> L48 ^T	AY907566, NC_008027
<i>P. soli</i> F-279208 ^T	HF930598, HF930597
<i>P. anguilliseptica</i> NCIMB 1949 ^T	X99540, NZ_FNSC01000001
<i>P. taeanensis</i> MS-3 ^T	FJ424813, HE800502
<i>P. seleniipraecipitans</i> CA5 ^T	FNBM01000016, HE800501
<i>P. punonensis</i> LMT03 ^T	JQ344321, JX435103
<i>P. straminea</i> IAM 1598 ^T	D84023, AB039600
<i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 ^T	HE978271, AJ633568
<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	AF094748, KR780035
<i>P. pelagia</i> CL-AP6 ^T	EU888911, FN908495
<i>P. bauzanensis</i> BZ93 ^T	GQ161991, FOGN01000001
<i>P. pertucinogena</i> NBRC 14163 ^T	NR_113650, FN554502
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107 ^T	CP000934, CP000934

Tabla A.3. Cepas del género *Pseudomonas* significativamente diferentes en cuanto al valor de los índices de actividad (o concentración de equivalentes de IAA por densidad celular) calculados para los mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal determinados en condiciones *in vitro*. Se indican los p-valores de los test *post-hoc* HSD de Tukey y Dunn (aplicando la corrección de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples) en caso de variables con distribución paramétrica o desconocida, respectivamente. Todos los test estadísticos fueron realizados a nivel de confianza del 95%.

Mecanismos directos						Mecanismos indirectos					
Producción sideróforos		Solubilización fosfato inorgánico				Producción compuestos indólicos		Degradación CMC		Degradación proteínas	
Cepas comparadas	p-valor	CaHPO ₄		Ca ₃ (PO ₄) ₂		Cepas comparadas	p-valor	Cepas comparadas	p-valor	Cepas comparadas	p-valor
		Cepas comparadas	p-valor	Cepas comparadas	p-valor						
p10 - p11	0.037	p14 - p19	0.050	p1 - p19	0.028	p11 - p18	0.034	p17-p1	0.006	p23-p3	0.019
p10 - p16	0.038	p16 - p24	0.027	p11 - p19	0.029	p18 - p24	0.042	p25-p1	0.038	p3-p37	0.041
p11 - p19	0.041	p19 - p24	0.024	p14 - p19	0.031	p11 - p4	0.043	p30-p1	< 0.001	p23-p45	0.039
p16 - p19	0.039	p24 - p31	0.042	p18 - p19	0.032	p24 - p4	0.035	p31-p1	0.040	p23-p53	0.041
p11 - p2	0.040	p1 - p33	0.046	p19 - p20	0.034	p18 - p47	0.039	p33-p1	0.012	p23-p55	0.035
p16 - p2	0.038	p14 - p33	0.036	p19 - p47	0.036	p11 - p52	0.035	p34-p1	0.014		
p10 - p24	0.042	p15 - p33	0.045	p1 - p50	0.029	p47 - p52	0.037	p36-p1	< 0.001		
p19 - p24	0.049	p17 - p33	0.040	p11 - p50	0.031	p11 - p57	0.036	p37-p1	0.003		
p2 - p24	0.043	p20 - p33	0.045	p14 - p50	0.034	p24 - p57	0.042	p42-p1	< 0.001		
p10 - p30	0.036	p24 - p33	0.024	p18 - p50	0.038	p47 - p57	0.040	p43-p1	< 0.001		
p13 - p30	0.048	p14 - p4	0.041	p20 - p50	0.043	p47 - p60	0.038	p44-p1	< 0.001		
p19 - p30	0.041	p17 - p4	0.044	p47 - p50	0.049	p18 - p62	0.042	p49-p1	< 0.001		
p2 - p30	0.038	p20 - p4	0.049	p19 - p51	0.038	p52 - p62	0.039	p54-p1	0.007		
p30 - p31	0.047	p24 - p4	0.020	p19 - p54	0.041	p57 - p62	0.049	p55-p1	0.002		
p1 - p42	0.036	p24 - p42	0.044	p19 - p55	0.044	p60 - p62	0.039	p61-p1	< 0.001		
p11 - p42	0.030	p24 - p44	0.043	p19 - p57	0.047	p18 - p9	0.042	p43-p10	0.025		
p12 - p42	0.039	p1 - p45	0.042			p52 - p9	0.039	p17-p11	0.030		
p16 - p42	0.037	p14 - p45	0.033			p57 - p9	0.044	p30-p11	< 0.001		
p24 - p42	0.031	p15 - p45	0.041			p60 - p9	0.040	p36-p11	0.002		
p30 - p42	0.046	p20 - p45	0.041					p37-p11	0.018		
p36 - p42	0.040	p24 - p45	0.033					p42-p11	0.001		
p11 - p43	0.047	p16 - p47	0.041					p43-p11	< 0.001		
p16 - p43	0.041	p19 - p47	0.033					p44-p11	< 0.001		
p30 - p43	0.041	p33 - p47	0.024					p49-p11	0.001		
p1 - p45	0.039	p4 - p47	0.026					p54-p11	0.034		
p11 - p45	0.034	p45 - p47	0.022					p55-p11	0.013		
p12 - p45	0.038	p24 - p48	0.041					p61-p11	< 0.001		
p16 - p45	0.039	p16 - p49	0.034					p17-p12	0.001		
p24 - p45	0.029	p19 - p49	0.026					p20-p12	0.021		
p36 - p45	0.044	p33 - p49	0.022					p25-p12	0.007		
p10 - p47	0.042	p4 - p49	0.021					p30-p12	< 0.001		

Anexos

p19 - p47	0.037	p45 - p49	0.022
p2 - p47	0.040	p33 - p55	0.037
p42 - p47	0.043	p4 - p55	0.043
p43 - p47	0.039	p45 - p55	0.034
p10 - p50	0.037	p19 - p57	0.041
p19 - p50	0.042	p33 - p57	0.032
p2 - p50	0.040	p4 - p57	0.035
p42 - p50	0.028	p45 - p57	0.028
p43 - p50	0.048	p16 - p60	0.037
p45 - p50	0.031	p19 - p60	0.031
p30 - p51	0.041	p33 - p60	0.021
p42 - p55	0.040	p4 - p60	0.024
p45 - p55	0.040	p45 - p60	0.021
p11 - p60	0.042	p1 - p7	0.036
p16 - p60	0.043	p10 - p7	0.046
p24 - p60	0.040	p11 - p7	0.043
p30 - p60	0.031	p14 - p7	0.028
p47 - p60	0.041	p15 - p7	0.034
p50 - p60	0.042	p17 - p7	0.031
p11 - p7	0.041	p18 - p7	0.044
p16 - p7	0.040	p20 - p7	0.036
p24 - p7	0.048	p24 - p7	0.04
p30 - p7	0.044	p47 - p7	0.021
p47 - p7	0.039	p49 - p7	0.027
p50 - p7	0.042	p55 - p7	0.029
		p57 - p7	0.025
		p60 - p7	0.026

p31-p12	0.007
p33-p12	0.002
p34-p12	0.002
p36-p12	< 0.001
p37-p12	< 0.001
p42-p12	< 0.001
p43-p12	< 0.001
p44-p12	< 0.001
p48-p12	0.027
p49-p12	< 0.001
p54-p12	0.001
p55-p12	< 0.001
p61-p12	< 0.001
p30-p15	0.003
p43-p15	< 0.001
p44-p15	0.001
p61-p15	0.001
p43-p16	0.038
p3-p17	0.002
p4-p17	0.013
p50-p17	< 0.001
p9-p17	0.001
p30-p18	0.003
p43-p18	< 0.001
p44-p18	0.002
p61-p18	0.001
p30-p2	< 0.001
p36-p2	0.009
p42-p2	0.007
p43-p2	< 0.001
p44-p2	< 0.001
p49-p2	0.007
p61-p2	< 0.001
p3-p20	0.048
p50-p20	0.010
p9-p20	0.025
p30-p24	0.014
p43-p24	0.002
p44-p24	0.007
p61-p24	0.006
p3-p25	0.017

p50-p25	0.003
p9-p25	0.008
p30-p3	< 0.001
p31-p3	0.018
p34-p3	0.006
p36-p3	< 0.001
p37-p3	0.001
p42-p3	< 0.001
p43-p3	< 0.001
p44-p3	< 0.001
p49-p3	< 0.001
p54-p3	0.003
p55-p3	0.001
p61-p3	< 0.001
p4-p30	< 0.001
p47-p30	0.024
p50-p30	< 0.001
p51-p30	0.003
p53-p30	0.011
p56-p30	0.018
p57-p30	0.001
p9-p30	< 0.001
p50-p31	0.003
p9-p31	0.009
p4-p33	0.024
p50-p33	0.001
p9-p33	0.002
p4-p34	0.028
p50-p34	0.001
p9-p34	0.003
p4-p36	0.001
p50-p36	< 0.001
p57-p36	0.021
p9-p36	< 0.001
p4-p37	0.007
p50-p37	< 0.001
p9-p37	0.001
p42-p4	< 0.001
p43-p4	< 0.001
p44-p4	< 0.001

p49-p4	< 0.001
p54-p4	0.014
p55-p4	0.005
p61-p4	< 0.001
p50-p42	< 0.001
p57-p42	0.017
p9-p42	< 0.001
p47-p43	0.004
p50-p43	< 0.001
p51-p43	< 0.001
p52-p43	0.034
p53-p43	0.002
p56-p43	0.003
p57-p43	< 0.001
p62-p43	0.043
p9-p43	< 0.001
p47-p44	0.013
p50-p44	< 0.001
p51-p44	0.001
p53-p44	0.006
p56-p44	0.010
p57-p44	< 0.001
p9-p44	< 0.001
p61-p47	0.010
p50-p48	0.013
p9-p48	0.032
p50-p49	< 0.001
p57-p49	0.017
p9-p49	< 0.001
p54-p50	< 0.001
p55-p50	< 0.001
p61-p50	< 0.001
p61-p51	0.001
p61-p53	0.005
p9-p54	0.001
p9-p55	< 0.001
p61-p56	0.008

