

**Universidad de Granada**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Microbiología**



**Impacto de inoculantes basados en  
*Azospirillum* modificado genéticamente sobre  
la diversidad y actividad de los hongos de la  
micorriza arbuscular en rizosfera de  
trigo y maíz**

**Tesis Doctoral**

**Carlos Collados Clares**

**Granada, 2006**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Carlos Collados Clares  
D.L.: Gr. 1414 - 20056  
ISBN: 978-84-338-4047-9

**Impacto de inoculantes basados en  
*Azospirillum* modificado genéticamente sobre  
la diversidad y actividad de los hongos de la  
micorriza arbuscular en rizosfera de  
trigo y maíz**

**Memoria que presenta el Licenciado  
Carlos Collados Clares  
Para optar al grado de Doctor**

**Fdo.: Carlos Collados Clares**

**Vº Bº  
Director del trabajo**

**Fdo.: José Miguel Barea Navarro  
Profesor de Investigación del CSIC**



Este trabajo ha sido realizado en el departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), gracias a una beca predoctoral asociada al proyecto de la Unión Europea: Ecological and Environmental Biosafety Assesment of Novel Plant and Microbial Biotechnology Products. ECO-SAFE QLK3-CT-2000-31759.



*A mis padres*



## Agradecimientos

Al fin llega este momento, tan lejano hace tan poco tiempo. Parecía que lo difícil terminaba en la conclusión de esta tesis, pero agradecer en unas pocas líneas a aquellos que de una u otra manera han colaborado siempre complica un poco más las cosas.

Al Dr. José Miguel Barea, por haber hecho posible esta tesis. Por ser un ejemplo de constancia en el trabajo y por su admirable carrera científica. Por enseñarme una manera diferente de viajar.

A la Dra. Rosario Azcón por su completa disposición ante cualquier cuestión cuando la necesité.

A la Dra. Conchi Azcón por su dedicación al grupo. A su rigor científico que tantas veces muestra y que nos sirve para pensar un poco más.

A la Dra. Nuria Ferrol por su ayuda en el laboratorio e interesarse por la tesis.

Al Dr. Alberto Bago por darme acceso a todo el material que he necesitado sin poner objeciones y responder a cuantas cuestiones le planteé.

Al Prof. Peter Jeffries, por acogerme en su grupo de la Universidad de Kent en Canterbury.

A Dr. “Don José” Olivares por interesarse todas las mañanas con su “Qué, ¿cómo va eso?”. Gracias por todas sus gestiones. Espero que siga recibiendo premios tan importantes como el último.

Al Dr. Juan Manuel Ruiz-Lozano, a ti Juanma, por tu paciencia cuando empecé, por ser un gran maestro e investigador. Por hacerme ver que la familia es lo primero, lo segundo y si te descuidas, hasta lo tercero. Gracias por tu amistad.

A los Dres. Rogelio Nogales, Esperanza Romero y Emilio Benítez, quienes me abrieron las puertas de su departamento cuando más lo necesitaba. Sin duda me habéis demostrado que hay una parte humana en la ciencia y ésta, está en la planta baja de la Casa Blanca. No imagináis lo mucho que ha significado para mí sentirme querido en vuestro grupo.

A la Dra. Mercedes Campos por permitirme “okupar” su laboratorio y por sus palabras de ánimo.

Al Dr. Juan Luis Ramos, por hacer de este lugar un Centro de Excelencia. A todo su grupo, un ejemplo de eficacia. A Maribel y a Manolo por su disponibilidad ante cualquier pregunta que les hice.

A Paqui, por su dedicación al grupo, sus palabras de ánimo y sin la cual el grupo sería un desastre.

A Custodia, incansable y alegre, siempre dispuesta a echar una mano sin importar cuándo. Por “pescar” la mayoría de las esporas de este trabajo, algo que yo solo nunca hubiera podido.

A mis compañeros de micorrizas, Pablejo e Iván, (los reyes del Spider) por los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio y fuera de él. El año que viene en San Patricio! A Ana Catarina, Adriana, Marcela, Carmen y Javi, ánimo que queda poco. A Rosa y Almu, por los ratos en el laboratorio.

A la generación anterior de becarios, Estefi, Coral, Maria del Mar, “la Pozo”, por enseñarme tantas cosas ese primer año, sobre todo el *Van Gogh*. A César, Javi y Alejandro (los *deformaticos*) siempre dispuestos a echarme una mano cuando os he necesitado y por esos desayunos.

A Pedro y a Alia por acogerme en Canterbury y tratarme como a un amigo desde el primer día. Espero que todo os vaya bien.

A África y Ester, dos “*emprendedoras*”, por ese buen carácter que siempre mostráis.

A mi querida Astricita, ejemplo de superación, por tu amistad durante estos años. Por gritarnos lo que hiciera falta y no tenerlo en cuenta después. Por qué sigamos así mucho tiempo, ¿vale?

A María, quien me aguantó en los momentos bajos y nunca me dejó a un lado. Por tener siempre una cervecita fría en su casa a la hora que fuera. Gracias por esos ratos que hemos pasado juntos.

A Belén, qué alegría haberte conocido, “*el placer ha sido tuyo*”. Poca gente transmite tanta alegría como tú. Por tener siempre palabras reconfortantes en el momento justo.

A mi querida Diana, posiblemente a quien mas cariño le tengo. Por tu amistad, por estar siempre alegre, preocuparte por mí y por los buenos momentos que hemos pasado. Algún día me enseñarás Bogotá, lo prometo.

A Jutta, cuya amistad me ha abierto las puertas de Alemania y demostrado que la distancia solo hace tener mas ganas de verse. Tenemos que recorrer Europa en moto. A Olga por su amistad, naturalidad e inocencia. Ve preparando un sitio para mí en Zurich!!!

A Ana Hurtado por esa Coronita que algún día nos tomaremos.

A Celia por su ayuda y recordarme que “*mucho guau-guau pero poco chau-chau*”. A Estefanía, mi compañera de escritura, por los ánimos que nos hemos dado. A Jesús por la piscina y el jacuzzi (sólo eso, eh!!). M<sup>a</sup> Luisa por su ayuda con el Photoshop, a M<sup>a</sup> José Lorite, gracias por tus consejos y por no tomarme nunca en serio. A resto de la gente de agroecología, compañeros y amigos. A Amparo, Herminia, Bea, Corina y Manuel Saavedra por vuestra compañía en el departamento. Laura, Mariú y demás... por lo bien que nos lo vamos a pasar en Berlín.

A mis amigos, Amada, José Ángel, Mamen, Carlota, Ana Domínguez, Ana León, Patri D., Chechu, Beatriz, Rosa y demás becarios, por aquella época de desmadre en el *Camborio*. A los demás becarios, compañeros de desayuno y de charlas en los pasillos.

A los amigos de siempre, a Juanan, siempre dispuesto a escuchar tomando un café, un par de cervezas o muchas copas. A Jesús “*Gusi*”, ¡Pedazo de padre que te has hecho! Por tu amistad durante todos estos años.

A la gente de mantenimiento, Antonio por tener las cámaras siempre a punto, a Germán por su ayuda con el trabajo “fino” en la parcela, Trescastro por su pasión por las setas, José Luis por sus comentarios sobre mis “compañías”. A Pedro por su ánimo al salir tarde.

A M<sup>a</sup> Antonia y Loles, mis *titas* de la casa amarilla, por su ayuda, preocupación y ánimos. Poca gente imagina todo lo que se hace en la Casa Amarilla para que este centro funcione. Yo si lo sé, así que gracias a M<sup>a</sup> Carmen Jaime, Mosi, Charito, M<sup>a</sup> Dolores, Joaquín, etc...

A Christina, por tu compañía y por haberme dado tanto durante este tiempo. Por tu ánimo en las horas bajas. Ya podemos hacer ese viaje que tenemos pendiente, y aunque tengamos que ir de camping, lo haremos. Gracias por todo, Ahhhpú!!!

Y sobre todo a mis padres, porque esta tesis es mas suya que mía. Por darme todo lo que ha estado en su mano para que nunca me faltara nada. Por haber sufrido conmigo este tiempo y aguantarme, que no es poco. A Luis (qué grande eres!) y Helena, por vuestra ayuda, que aunque lejos, siempre habéis estado muy cerca. A Jaime y Maite por haberme tratado como a un hijo mas. A la yaya, por su cariño y por pedir tanto por nosotros, seguro que ayuda, gracias. A mi abuela, quien nos ha querido más que a ella misma, por entregarnos toda tu vida para que nosotros seamos felices.



“...Salimos de Salamanca, y, llegando a la puente, está a la entrada della un animal de piedra que casi tiene forma de toro, y el ciego mandóme que llegase cerca del animal, y, allí puesto, me dijo:

-Lázaro, llega el oído a este toro y oirás gran ruido dentro dél.

Yo, simplemente, llegué, creyendo ser así. Y, como sintió que tenía la cabeza par de la piedra, afirmó recio la mano y diome una gran calabazada en el diablo del toro, que más de tres días me duró el dolor de la cornada, y díjome:

-Necio, aprende: que el mozo del ciego un punto ha de saber más que el diablo.

Y rió mucho la burla.

Parescióme que en aquel instante desperté de la simpleza en que, como niño, dormido estaba. Dije entre mí: «Verdad dice éste, que me cumple avivar el ojo y avisar, pues solo soy, y pensar cómo me sepa valer».

Comenzamos nuestro camino, y en muy pocos días me mostró jerigonza. Y como me viese de buen ingenio, holgábase mucho y decía:

-Yo oro ni plata no te lo puedo dar; mas avisos para vivir, muchos te mostraré.

Y fue así, que, después de Dios, éste me dio la vida, y, siendo ciego, me alumbró y adestró en la carrera de vivir...”

La Vida De Lazarillo De Tormes  
Y De Sus Fortunas Y Adversidades  
Anónimo. S. XVI



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. <b>Naturaleza, Interés y finalidad de la investigación .....</b>	<b>1</b>
2. <b>Objetivos .....</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. <b>Antecedentes bibliográficos.....</b>	<b>4</b>
3.1. Agricultura sostenible: concepto, realidades y perspectivas.....	4
3.2. La rizosfera: Impacto de los microorganismos rizosféricos en el crecimiento, nutrición y salud de las plantas.....	6
3.3. Azospirillum: Su significado en Agricultura .....	9
3.4. Micorrizas arbusculares: su significado en Agricultura Sostenible .....	11
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
1. <b>Caracterización del suelo.....</b>	<b>27</b>
2. <b>Material vegetal.....</b>	<b>27</b>
Obtención y cultivo de las plantas .....	27
3. <b>Características de los inoculantes de Azospirillum.....</b>	<b>28</b>
4. <b>Preparación de inoculos e inoculación de bacterias:.....</b>	<b>30</b>
Inoculación de semillas pregerminadas .....	30
Inoculación de cultivos monoxénicos.....	30
5. <b>Medios de cultivo.....</b>	<b>31</b>
LB (Luria Bertani) .....	31
YEP (Extracto de levadura peptona) .....	31
NFB (Nitrogen Free malate).....	32
M9 (Medio Mínimo).....	32
MES 32	
Medio M33	
Exudados radicales .....	33
Solución nutritiva (Hewitt, 1966).....	34
Solución Ringers.....	34
6. <b>Hongos Micorrícicos .....</b>	<b>35</b>
6.1. Extracción de esporas de hongos MA del suelo.....	35
6.2. Identificación morfológica de esporas de hongos MA.....	35
6.3. Producción de inóculos puros de hongos micorrícicos .....	36
6.4. Estimación del potencial micorrícico del suelo.....	36
6.5. Tinción de raíces micorrizadas.....	37

6.6.	Determinación del porcentaje de micorrización.....	37
<b>7.</b>	<b>Caracterización molecular de los hongos micorrícicos.....</b>	<b>37</b>
7.1.	Amplificación de ADN de esporas por PCR.....	38
7.2.	Amplificación de Endofitos en Raíces.....	38
7.2.1.	Extracción de ADN de raíces.....	38
7.2.2.	Visualización de ADN mediante separación electroforética en geles de agarosa.....	39
7.2.3.	Separación de fragmentos de ADN mediante TTGE.....	40
7.2.4.	Extracción de ADN a partir de geles de poliacrilamida.....	41
7.2.5.	Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	41
7.2.6.	Ligación en vectores de clonación.....	41
7.2.7.	Preparación de células competentes de E.coli.....	42
7.2.8.	Transformación de E. coli DH5 $\alpha$ .....	42
7.2.9.	Extracción de ADN plasmídico de E. coli.....	43
7.2.10.	Secuenciación de productos de PCR.....	43
7.2.11.	Análisis de las secuencias nucleotídicas.....	43
7.3.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	44
<b>8.</b>	<b>Estudio filogenético.....</b>	<b>45</b>
<b>9.</b>	<b>Actividades enzimáticas en raíces micorrizadas.....</b>	<b>45</b>
9.1.	Actividad Fosfatasa alcalina.....	45
9.1.1.	Trigo (ELF-97 <sup>®</sup> ).....	45
9.1.2.	Maíz.....	45
9.2.	Determinación de AIA.....	46
<b>10.</b>	<b>Actividades Enzimáticas en suelo.....</b>	<b>46</b>
10.1.	Determinación de AIA en suelo (Wöhler, 1997).....	46
10.2.	Actividad deshidrogenasa.....	47
10.3.	Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	48
10.4.	Actividad fosfatasa.....	48
<b>11.</b>	<b>Análisis estadístico de los resultados.....</b>	<b>49</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>1.</b>	<b>Propiedades básicas de los inóculos de Azospirillum.....</b>	<b>53</b>
1.1.	Capacidad para establecimiento y recuperación de Azospirillum inoculado en raíces de maíz y trigo.....	53
1.1.1.	Introducción.....	53
1.1.2.	Material y métodos.....	54
1.1.3.	Resultados.....	55
1.1.4.	Discusión.....	57
1.2.	Capacidad para producir AIA in vitro. Uso de un inductor del gen ipdC y un precursor de AIA.....	59

1.2.1. Introducción .....	59
1.2.2. Material y métodos.....	62
1.2.3. Resultados .....	62
1.2.4. Discusion.....	64
1.3. Efectos sobre la longitud radical y colonización.....	66
1.3.1. Introducción .....	66
1.3.2. Material y Métodos .....	66
1.3.3. Resultados .....	67
1.3.4. Discusión.....	69
<b>2. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> en interacción con poblaciones naturales de hongos MA .....</b>	<b>71</b>
2.1. Efectos sobre el crecimiento vegetal, colonización y actividad MA, la comunidad bacteriana de la rizosfera y actividades enzimáticas del suelo 71	
2.1.1. Introducción .....	71
2.1.2. Material y Métodos específicos.....	74
2.1.2.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (PAL) .....	75
2.1.2.2. Succionato Deshidrogenasa (SDH).....	75
2.1.2.3. Análisis RISA .....	75
2.1.3. Resultados .....	76
2.1.3.1. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre la producción de biomasa por plantas de trigo .....	76
2.1.3.2. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre la formación de las MA.....	76
2.1.3.3. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre la actividad PAL.....	77
2.1.3.4. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre las poblaciones microbianas del suelo .....	78
2.1.3.5. Potencial micorrízico residual del suelo. ....	79
2.1.4. Discusión.....	80
2.2. Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre la producción de grano.....	82
2.1.1. Introducción .....	82
2.1.1. Materiales y Métodos .....	82
2.1.1. Resultados (Experimento 2.2).....	83
2.1.1. Discusión.....	85
<b>3. Impacto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> Wt y GM sobre La diversidad DE los hongos MA naturalmente presentes en el suelo objeto de estudio.....</b>	<b>87</b>
3.1. Introducción .....	87
3.2. Materiales y Métodos.....	89
3.2.1. Producción de cultivos puros de hongos MA aislados de la parcela experimental .....	89
3.2.2. Análisis molecular de los hongos MA aislados .....	89

3.2.3. Análisis filogenético de los aislados.....	89
3.2.4. Estudios de biodiversidad de hongos MA .....	90
3.2.5. Identificación de hongos MA que colonizan las raíces .....	91
3.3. Resultados.....	91
3.3.1. Aislamiento, identificación y filogenia de las especies presentes en el suelo objeto de estudio. ....	91
3.3.2. Impacto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre la diversidad de hongos MA .....	96
3.3.3. Identificación de hongos MA que colonizan raíces.....	99
3.4. Discusión .....	101
<b>4. Impacto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> WT y GM sobre distintas facetas del ciclo de vida de hongos MA.....</b>	<b>105</b>
4.1. Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre la germinación de esporas de hongos MA in vitro.....	105
4.2. Efectos de la co-inoculación de <i>Azospirillum</i> y <i>G. mosseae</i> sobre el desarrollo y función de la MA en maíz. ....	109
<b>5. Estudio de la interacción de <i>Azospirillum</i> WT y GM con hongos MA mediante el uso de proteínas fluorescentes.....</b>	<b>113</b>
5.1 Introducción.....	113
Microscopía confocal.....	114
Uso de proteínas fluorescentes para el seguimiento de las bacterias en la rizosfera/micorrizosfera.....	114
5.2 Material y Métodos.....	115
5.2.1 Obtención de <i>A. brasilense</i> Sp245 marcado con las diferentes proteínas fluorescentes por conjugación triparenteral .....	115
5.2.2.1. Experimento Conjugación triparenteral .....	116
5.2.2.2. Conjugación triparenteral de <i>A. brasilense</i> Sp245 .....	116
5.2.2.3. Estabilidad de los plásmidos en <i>A. brasilense</i> sp245 .....	117
5.2.2. Observación de estructuras fúngicas y raíces colonizadas .....	118
5.2.2.1. Extracción de material a partir de cultivo monoxénico.....	118
5.2.3. Uso del Microscopio Confocal .....	118
5.3. Resultados.....	119
5.3.1. Comprobación de la fluorescencia de <i>A. brasilense</i> transformados .....	119
5.3.2. Determinación de la capacidad de adhesión bacteriana a estructuras fúngicas.....	119
5.3.3. Visualización y comparación del patrón de colonización de <i>A. brasilense</i> WT o GM.....	121
5.3.3.1. Determinación de la colonización bacteriana sobre estructuras fúngicas .....	121
5.3.3.2. Determinación de la colonización bacteriana sobre raíces micorrizadas .....	123
5.4. Discusión .....	126

<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>135</b>



## ***I. Introducción***



# ***I. INTRODUCCIÓN***

## ***1. Naturaleza, Interés y finalidad de la investigación***

La aplicación de técnicas innovadoras basadas en el uso de productos de desarrollos biotecnológicos para la promoción del sector agroalimentario es un tema de creciente y vigente interés, si bien no se contempla de forma totalmente favorable por parte de la Sociedad. Una de las principales razones por las que no ocurre una aceptación generalizada de los productos biotecnológicos es el hecho de que no se aprecie un beneficio obvio y tangible de los mismos. Sin embargo, algunos productos comienzan a ser aceptados en cuanto a que se está demostrando su capacidad para solventar demandas específicas ante determinadas situaciones preocupantes. Entre tales productos “amigos del Medio Ambiente” se encuentran los *inoculantes microbianos*, reconocidos por su capacidad para mejorar la nutrición y crecimiento de las plantas, hacerlas más resistentes al ataque de patógenos y a los estreses abióticos y, en suma, a incrementar la productividad agrícola. Se puede afirmar que la Sociedad está concienciada de que el uso incontrolado de pesticidas, fungicidas y fertilizantes químicos, puede acarrear serios problemas ambientales.

Por las razones antes expuestas, se comienza a aceptar que ciertos avances de la biotecnología, tales como los inoculantes microbianos, pueden ser una alternativa a los agroquímicos en el contexto de una Agricultura más respetuosa con el medio ambiente y sostenible. En este sentido, se están investigando diversos tipos de inoculantes microbianos como “biofertilizantes”, “bioprotectores”, “fitoestimuladores”. Concretamente, estos últimos, son objetivo de la presente investigación.

Quizás el más conocido de tales inoculantes “fitoestimuladores” es el basado en bacterias del género *Azospirillum*. En efecto, se ha demostrado que la inoculación de las raíces de las plantas con *Azospirillum* spp., produce un incremento en el desarrollo del sistema radical de la planta, lo cual conlleva una mejora de la capacidad de esta para utilizar de forma más eficaz los fertilizantes nitrogenados, por lo que pueden ser aplicados a dosis mucho más bajas. Este es un hecho fundamental ya que se conoce que hay una gran discrepancia entre la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado y la que es realmente utilizado por la planta (“bajo coeficiente de utilización”). Por esta razón, puede quedar un exceso de compuestos nitrogenados en el ecosistema lo que representa la mayor fuente de contaminación por N tanto en la atmósfera (óxidos de N) como en las aguas superficiales y profundas (nitratos).

En el contexto del proyecto ECO-SAFE de la UE se desarrolla investigación orientada a evaluar las consecuencias ecológicas de la utilización de nuevos productos biotecnológicos, entre ellos los inoculantes microbianos a base de *Azospirillum*, para contribuir a lograr la sostenibilidad de la agricultura europea. Adicionalmente, se ha demostrado que los efectos de *Azospirillum* como

fitoestimuladores, y sus beneficios en relación con la utilización más eficaz de N, pueden ser mejorados mediante manipulación genética (microorganismos GM) de aislados naturales (WT) de esta bacteria. Es por ello que ECO-SAFE trata también de obtener inoculantes mejorados (a base de bacterias GM). En consecuencia, este proyecto también se ocupa de desarrollar y aplicar una estrategia que proporcione la información clave para determinar el impacto ecológico de la liberación de bioinoculantes GM y predecir su destino en el medio ambiente.

ECO-SAFE propone liberar aislados WT y GM de *Azospirillum*, formulados como bio-inoculantes, con una vida media aceptable, en ensayos de campo manejados según las prácticas agrícolas habituales, y en interacción con diferentes niveles de fertilización con N químico. *Azospirillum* es una bacteria particularmente adaptada a la rizosfera de los cereales. Consecuentemente, los cultivos “diana” propuestos son trigo y maíz, claves en muchas áreas de la UE.

El Grupo “Micorrizas” del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbiótico de esta Estación Experimental del Zaidín (CSIC) forma parte del consorcio de Instituciones Académicas y Entes Industriales que participan en ECO-SAFE. El trabajo Doctoral que se recoge en esta Memoria es precisamente el resultado de tal contribución al mencionado proyecto. Este trabajo recoge diversas investigaciones y experimentos orientados, primordialmente, a alcanzar uno de los Objetivos de ECO-SAFE: “To assess the impact of WT and GM bacterial phytostimulators on the diversity and function of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the rhizosphere, under commercial field conditions”. Sin embargo, el tema del trabajo que conforma esta Tesis Doctoral es más complejo y diverso que el que este Objetivo enuncia de manera resumida. El contenido de la investigación que se propone se explica a continuación, después de una breve reseña del concepto y significado de los hongos formadores de micorrizas.

Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo. Estas simbiosis desempeñan un papel clave en el ciclado de nutrientes en el ecosistema y en la protección de las plantas frente a estreses ambientales. La mayoría de las especies de plantas silvestres y cultivadas forman micorrizas, siendo las llamadas “micorrizas arbusculares” (en adelante “micorrizas”) las más comunes y, concretamente, las que forman las plantas de interés agronómico, entre ellas cereales, leguminosas, hortícolas y frutales. Dados los efectos de las micorrizas como biofertilizantes, fitoestimuladores y bioprotectores de los cultivos (como después se detalla en al analizar los Antecedentes Bibliográficos del tema, se acepta que el manejo apropiado de esta simbiosis pueda permitir una reducción significativa de fertilizantes y fungicidas químicos, aspectos claves en una producción sostenible en agricultura, con los consiguientes beneficios ecológicos y económicos.

Es evidente, por lo que antecede, que los hongos micorrícicos y su simbiosis con la planta, las micorrizas, son un componente clave en la estabilidad, sostenibilidad y productividad de los agro-ecosistemas. Por ello, el hecho de que cualquier perturbación que sufra el sistema suelo-planta pueda afectar la

diversidad o funcionalidad de estos hongos y/o simbiosis, puede repercutir en los beneficiosos efectos de las micorrizas.

Los inoculantes microbianos, sobre todo si incluyen microorganismos GM, representan un riesgo que la Directiva EEC 90/220 de la UE exige investigar. Tales inóculos puedan afectar formación y funciones de la micorriza. Teniendo en cuenta los efectos de *Azospirillum* sobre la morfología y arquitectura del sistema radical, es obvio que estos cambios puedan afectar la formación y efectos de las micorrizas, circunstancias que propone investigar este proyecto. Es mas, dados los efectos beneficiosos de las micorrizas y *Azospirillum*, es obvio esperar que, incluso, puedan desarrollarse interacciones positivas entre los microorganismos implicados.

Como se ha indicado anteriormente, las investigaciones que se proponen se basan en el uso de inoculantes de *Azospirillum* desarrollados en el contexto de ECO-SAFE tienen los Objetivos siguientes.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Analizar el impacto de la inoculación de *Azospirillum* spp. (WT y GM), seleccionados por su eficacia como fitoestimuladores, sobre la diversidad y actividad de las poblaciones naturales de hongos micorrícicos, así como diversos aspectos básicos de su interacción con la micorriza (formación y efectos).

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Desarrollar y aplicar técnicas que permitan el seguimiento de los *Azospirillum* inoculados en la rizosfera de plantas micorrizadas.
2. Evaluación del efecto de la modificación genética en *Azospirillum* sobre la capacidad de producción de ácido indol-acético.
3. Evaluación de los cambios producidos por la inoculación de *Azospirillum* en la morfología del sistema radical de plantas micorrizadas.
4. Caracterizar y utilizar marcadores enzimáticos que permitan evaluar la actividad de los hongos micorrícicos que colonizan las raíces.
5. Evaluar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre de la diversidad y potencial simbiótico de hongos micorrícicos en los sistemas suelo-planta objeto de estudio.

6. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* GM sobre las plantas micorrizadas
7. Identificación de los hongos MA presentes en el suelo objeto de estudio.
8. Estudio del efecto de la inoculación de *Azospirillum* GM sobre la biología de los hongos MA.
9. Determinar de la capacidad de adhesión de *Azospirillum* GM sobre estructuras fúngicas y raíces micorrizadas.
10. Evaluar el patrón de colonización de la cepa GM con respecto a la cepa silvestre

Para alcanzar dichos Objetivos se diseñaron diversos ensayos, que se han agrupado para su presentación en esta Memoria en Capítulos Experimentales. En cada uno de estos se presenta una breve Introducción en la que se incide en los Antecedentes Bibliográficos específicos del Capítulo correspondiente. Sin embargo, y como es habitual, se presenta una Revisión General de Antecedentes Bibliográficos de los diferentes componentes científicos de este trabajo doctoral.

### **3. Antecedentes bibliográficos**

La información disponible se va a analizar sistematizada como sigue:

1. Agricultura Sostenible: concepto, realidades y perspectivas
2. La rizosfera: impacto de los microorganismos rizosféricos en el crecimiento, nutrición y salud de las plantas
3. *Azospirillum*: Su significado en Agricultura Sostenible
4. Micorrizas arbusculares: Su significado en Agricultura Sostenible
5. Inoculantes microbianos.

#### **3.1. Agricultura sostenible: concepto, realidades y perspectivas**

Hace 10-15000 años, con el comienzo de la agricultura, empezaron a sucederse profundos cambios en la forma de vida del hombre, que pasa de ser nómada a sedentario, formando los primeros asentamientos estables. Este hecho representó un cambio trascendental en el equilibrio biológico natural. Es obvio que existe una interacción constante entre la agricultura y el medio ambiente. La producción de los sistemas agrícolas depende en gran manera de los recursos naturales para sostener su desarrollo. Los progresos de la agricultura han modificado esta dependencia reduciendo los obstáculos ambientales a la producción, mediante el desarrollo de tecnologías como el riego, la mejora genética, la lucha contra las plagas y enfermedades o la fertilización de suelos con

productos agroquímicos. En el siglo XX, tras la II Guerra Mundial, se manifestó una explosión demográfica con la consiguiente demanda de alimentos, esto dio lugar a la llamada "revolución verde", que supuso el cultivo selectivo de determinadas especies tradicionales con objeto de obtener el máximo rendimiento. Durante varias décadas se han utilizado en agricultura lo que se ha venido a llamar "agricultura intensiva", unas prácticas agresivas basadas en el uso de dosis elevadas de fertilizantes químicos para el incremento de la producción y otros productos agroquímicos tales como funguicidas, plaguicidas y otros fitofármacos empleados para el proteger a los cultivos frente a enfermedades y plagas. En la actualidad, este tipo de procesos están siendo reconsiderados debido a las posibles consecuencias negativas que pueden afectar tanto al medio ambiente como a la población.

La agricultura sostenible puede definirse como "la manera de cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medioambiental. Su consecuencia es la producción de alimentos y fibras usando sistemas que permiten obtener máximos beneficios, de acuerdo con la demanda, de la capacidad productiva inherente de los recursos naturales" (Benbrook, 1991). Este tipo de agricultura debe permitir ingresos adecuados a los agricultores, proporcionar suficientes alimentos a los consumidores, preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros [Benbrook, 1999 (<http://www.pmac.net/IWFS.pdf>)]

Para que las prácticas culturales se sitúen en el contexto de la agricultura sostenible deben seguir unas normas generales básicas que pueden resumirse de la siguiente manera:

- a. Potenciar la incorporación a las prácticas agrícolas de procesos naturales tales como ciclado biogeoquímico de los nutrientes y el aprovechamiento de los organismos capaces de ejercer efectos de control biológico.
- b. Uso del potencial biológico y genético de las especies animales y vegetales con vista a un incremento en la productividad.
- c. Evitar o reducir en la medida de lo posible el uso de aquellos recursos no renovables o cuya utilización suponga un riesgo para el medio ambiente o la salud del agricultor o de los consumidores.
- d. Mejorar la relación "distribución de cultivos/ potencial productivo/ limitaciones físicas del terreno".
- e. Integración óptima de la agricultura y la ganadería, que permita una producción eficiente y rentable sin menoscabo de la prevención de enfermedades y la conservación del suelo, el agua, la energía y los recursos biológicos.

El concepto de agricultura sostenible no persigue la disminución drástica ni eliminación del uso de fertilizantes químicos y de fitofármacos. Por definición, "un desarrollo sostenido implica un uso racional de los recursos renovables y la utilización mínima de materiales o procesos cuya producción y desarrollo conlleva consumo de energía de fuentes no renovables" (Altieri 1994). La clave

de la utilización de estos recursos efectivos está en emplearlos de una forma racional. El término racional implica un uso controlado, suficiente como para obtener un aumento de la producción con una menor dependencia de los productos agroquímicos y el menor daño posible para el medio ambiente. No se trata por tanto, de “Agricultura Biológica Estricta”, sino de una estrategia que permita una mejor alimentación de la población así como de garantizar la calidad del medio ambiente y la disponibilidad de recursos naturales para las generaciones futuras.

### **3.2. *La rizosfera: Impacto de los microorganismos rizosféricos en el crecimiento, nutrición y salud de las plantas***

Las poblaciones de microorganismos que viven en el suelo libre de raíces se mantienen a un mínimo de actividad, impuesto por el carácter de heterotrofia que hace a los microorganismos dependientes de un aporte de C metabolizable. Este aporte lo consiguen los microorganismos, fundamentalmente, en los exudados radicales. Sin embargo, la presencia de las raíces cambia drásticamente la vida de los microbios, ya que la planta es la fuerza motriz del sistema). A principios del siglo XX, Hiltner introdujo el término *rizosfera* para referirse a la zona del suelo influenciada por el desarrollo de las raíces, en donde se activa la proliferación de los microorganismos (Hiltner, 1904). Este efecto, de la presencia de las raíces, denominado *efecto rizosférico*, se debe al suministro de exudados radicales que contienen azúcares, aminoácidos, vitaminas, enzimas, así como otros componentes (mucílagos, detritus, lisados, secreciones, etc), además de señales que modulan las interacciones microbio-planta (Lynch, 1990; Werner, 1998; Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999).

Las propiedades físicas, químicas y biológicas de la rizosfera son muy diferentes a las del suelo no rizosférico y, particularmente, la población microbiana desciende al alejarse de la superficie radical, pudiendo disminuir del orden de 10-100 veces en unos pocos milímetros. El hecho de que entre los exudados radicales se encuentren además de sustancias solubles, otras de carácter volátil, capaces de difundir largas distancias, implica que puedan ejercer acción de mensajeros incluso mas rápidamente que algunas difusibles en agua. Esto es de gran importancia, ya que los microorganismos pueden ser estimulados por señales de la planta lejos de la superficie radical (varios centímetros en el suelo) Además de los microorganismos presentes en la rizosfera hay que señalar a aquellos que colonizan la propia raíz, es decir, a los endofitos, tanto beneficiosos como patógenos.

Las poblaciones rizosféricas están compuestas por bacterias, hongos, algas, nematodos, protozoos y virus, pero la mayor parte de las investigaciones se centran principalmente en hongos y bacterias (Bowen & Rovira, 1999; Gryndler 2000). En términos generales se estima que existen unas 30.000 especies de bacterias y 1.500.000 de hongos de los cuales sólo un 8% y 1% respectivamente, han sido identificados (Kennedy & Smith, 1995; Barea, 2000). En esto contexto,

hay que referir que la utilización de técnicas basadas en el análisis de moléculas de ADN ha puesto de manifiesto que entre el 90 y el 99 % de los microorganismos del suelo son viables pero no cultivables (Barea *et al* 2005 b), por lo que solo dichas técnicas están permitiendo la caracterización de los microorganismos y conocer sus relaciones filogenéticas.

Los microorganismos tienen un protagonismo destacado en el sistema suelo-planta, ya que desarrollan diversas actividades que afectan el desarrollo, nutrición y salud de la planta y benefician la calidad del suelo (Barea & Olivares, 1998; Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999; Barea *et al.*, 2004). Las acciones que resultan beneficiosas para el sistema suelo-planta pueden concretarse de la manera siguiente:

- a. Fitoestimulantes. Estimulación de la germinación de las semillas y del enraizamiento por la producción de hormonas, vitaminas y otras sustancias.
- b. Biofertilizantes. Incrementan el suministro o disponibilidad de los nutrientes por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, tales como la fijación de N, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de nutrientes integrados en compuestos orgánicos.
- c. Mejoradores de agrosistemas. Mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables.
- d. Agentes de control biológico de patógenos. Desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio, entre los que cabe destacar los géneros *Bacillus*, *Trichoderma* y *Pseudomonas*.
- e. Biorremediadores. Eliminan productos xenobióticos tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas.
- f. Mejoradores ecofisiológicos. Incrementan la resistencia/tolerancia a estreses tanto bióticos como abióticos.

### **Principales tipos de microorganismos rizosféricos**

Aceptado que bacterias y hongos son los dos tipos de microorganismos sobre los que se centra la mayoría de la investigación en biología de la rizosfera, la primera distinción que se puede hacer dentro de estos dos grupos principales de microorganismos es dividirlos entre saprófitos y simbioses. Ambos grupos incluyen hongos y bacterias que pueden resultar perjudiciales, neutros o beneficiosos para la planta. Es de sobra conocido que los saprófitos beneficiosos, que abarcan diversos grupos microbianos, juegan un papel fundamental en el agroecosistema y en la sostenibilidad de ecosistemas naturales, por eso algunos de ellos pueden ser usados como inoculantes para mejorar el desarrollo y la salud vegetal (Alabouvette *et al.*, 1997; Dobbelaere *et al.*, 2001; Probanza *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2004 & 2005a). Estos incluyen (i) degradadores de compuestos tóxicos, (ii) PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y (iii)

bacterias y hongos antagonistas de patógenos. Algunos de estos microorganismos son endofitos y son capaces de promover el crecimiento y la protección vegetal. Los simbióticos mutualistas incluyen a bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y a los hongos formadores de las micorrizas. El género *Azospirillum* incluido en el grupo PGPR y los hongos micorrícicos dada su incidencia directa en los objetivos de esta Tesis se tratará en profundidad mas adelante.

En el caso de la simbiosis mutualista se ha llegado a un grado de especialización tal, que se hace necesario que aunque ambos componentes sean capaces de vivir de forma separada, ciertas actividades fisiológicas sólo pueden llevarlas a cabo cuando ambos viven conjuntamente. Por otro lado, existen casos intermedios entre vida libre y simbiosis denominadas “simbiosis asociativas” en las cuales los organismos pueden vivir en asociación íntima con la planta, aunque en condiciones naturales no necesitan de ella para llevar a cabo sus actividades fisiológicas.

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia (suelo rizosférico) son denominadas “rizobacterias” (Kloepper, 1994 y 1996). Las Rizobacterias beneficiosas conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), desempeñan funciones clave para la planta tales como: control biológico de la patógenos mediante efectos antagonistas o Inducción de Resistencia Sistémica (Van Loon *et al.*, 1998), incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales como por ejemplo la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno o la fitoestimulación al estimular la emergencia o el enraizamiento (Kloepper *et al.*, 1991, Hass, 1991, O’Gara *et al.*, 1994; Welller & Thomashow, 1994, Glik, 1995, Broek & Vanderleyden, 1995; Bashan y Holguin 1998; Barea, 2000; Probanza *et al.*, 2002; de Boer *et al.*, 2003; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2004). Las PGPR deben de cumplir tres características intrínsecas (i) ser capaces de colonizar la raíz, (ii) deben ser capaces de sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural al menos hasta ejercer el su actividad promotora del crecimiento y (iii) deben ser capaces de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

En el proceso de colonización la bacteria es atraída por quimiotaxis a la rizosfera por los exudados radicales para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias como por ejemplo *Azospirillum* spp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-Leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacteria*, *Hafnia*, *Klebsiela*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan & Levanony, 1990; Okon & Lavandera González, 1994, Tang, 1994; Barea *et al.*, 2004).

De todos los microorganismos que colonizan la rizoplana y la rizosfera, los mas comunes son las bacterias Gram-negativas, y de todas ellas parece que el género *Pseudomonas* es el que predomina, probablemente debido a su gran

versatilidad metabólica (Bolton *et al.*, 1993), que contribuye a su competitividad, al igual que lo hace la capacidad de quimiotaxis y adherencia a raíces en el caso de *Azospirillum* (Vande Broek & Vanderleyden, 1995a).

Las PGPR pueden afectar al crecimiento vegetal, bien de forma directa mediante el suministro de determinados compuestos a las planta, o facilitando la captación de nutrientes (fundamentalmente *Azospirillum* spp.), o bien pueden actuar de forma indirecta evitando los efectos deletéreos de uno o mas organismos fitopatógenos (fundamentalmente *Pseudomonas* spp.), de ahí que actualmente se tienda a clasificar o dividir a las PGPR en dos grupos: “PGPB” (Plant Growth Promoting Bacteria) y “Biocontrol-PGPB” (Bashan & Holguin, 1998). El cambio del término “PGPR” por “PGPB” se debe a que muchas bacterias que ejercen efectos beneficiosos sobre la planta no son rizobacterias. (Bashan & Levanony, 1990) defienden la actuación conjunta de los mecanismos, siendo los mecanismos individuales menos importantes que si operan de manera aislada.

### 3.3. *Azospirillum*: Su significado en Agricultura

*Azospirillum* es el género mejor caracterizado de las PGPR siendo *A. brasilense* representa la especie mas estudiada del género (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Su actividad promotora del crecimiento fue descrita en la década de los 70 por J. Döbereiner y colaboradores en Brasil.

Las diferentes especies han sido aisladas de las rizosferas de diferentes pastos y cereales de todo el mundo tanto de climas tropicales como de templados (Weber *et al.*, 1999 Döbereiner y Day 1976; Patriquin, *et al.*, 1983) El género *Azospirillum* ha demostrado su efecto beneficioso sobre el crecimiento vegetal tanto en cultivos de invernadero como en campo abierto. Los resultados de 20 años de estudios han demostrado que entre el 60 y 70% de los experimentos llevados a cabo han tenido éxito, con un incremento significativo en la producción que varía entre el 5 y el 30%.

Se han descrito 7 especies dentro del género, *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraefens* y *A. irakense* *A. doebereinearae* y *A. largomibile* transferido del género *Conglomeromonas* a *Azospirillum* en base a su proximidad filogenética (Dekhil *et al.*, 1997).

#### Características generales de *Azospirillum*

*Azospirillum* ( $\alpha$ -subclase de las proteobacterias) es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizosfera de plantas. Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico. Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum* puede utilizar un amplio rango de sustratos, amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, puede enquistarse, recubriéndose de

una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de  $\beta$ -hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente carbonada.

Es una bacteria móvil, que muestra gran variabilidad en el número y posición de sus flagelos. En medio líquido produce un solo flagelo mientras que en medio sólido se inducen diversos flagelos laterales, siendo diferente la cantidad y posición de estos flagelos para cada una de las especies del género *Azospirillum*. La presencia de flagelos proporciona la movilidad necesaria para dirigirse hacia lugares donde la presencia de nutrientes sea más favorable. Presenta quimiotaxis positiva hacia ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, compuestos aromáticos y hacia exudados radicales. Esta capacidad de migración se ha visto que es altamente dependiente de la humedad del suelo. Este género además tiene tendencia a dirigirse hacia lugares donde la concentración de oxígeno sea la adecuada (denominada aerotaxis). Este comportamiento permite a la bacteria dirigirse hacia un nicho ecológico apropiado en la rizosfera donde poder producir la fijación biológica del nitrógeno y sustancias estimuladoras del crecimiento.

Numerosos estudios destacan la capacidad de *Azospirillum* para estimular el crecimiento vegetal, la producción de las cosechas y el contenido en N de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2001). Este efecto estimulante se ha atribuido a diversos mecanismos, entre los cuales se encuentran la fijación de N y la producción de auxinas. Respecto a la primera, se ha cuestionado mucho que este sea un factor importante, ya que las cantidades de amonio secretadas por la bacteria no son muy significantes. De hecho, tiene mayor consideración la producción de sustancias promotoras del crecimiento y el incremento en la tasa de adquisición de nutrientes por las raíces. Se ha visto que tras la inoculación de la bacteria, el sistema radical sufre un cambio en la morfología debido a la producción de estas sustancias promotoras del crecimiento. El número de raíces secundarias y pelos radicales se incrementa, produciendo un aumento en el área explorada del suelo y mejorando de esta forma la tasa de adquisición de nutrientes. Para que este efecto se produzca de manera correcta, la bacteria debe secretarlas lo más cerca posible de la raíz. La asociación con las raíces sólo puede tener éxito si es capaz de mantener una población significativa en el entorno rizosférico. La movilidad y la quimiotaxis permiten a la bacteria moverse hacia las raíces, donde se pueden beneficiar de los exudados radicales que actúan como fuente de carbono y energía. El mecanismo exacto por el cual *Azospirillum* interacciona con la raíz no es muy bien conocido, pero se conocen una serie de genes que están implicados en este proceso (Steenhoudt, y Vanderleyden, 2000). La adhesión de *Azospirillum*. a la planta es esencial para la eficiente asociación con la planta hospedadora.(Michiels *et al.*, 1991) mediante ensayo in-vitro, demostraron que la adhesión a la raíz es un proceso bifásico. En una primera etapa, grupos de células individuales se adhieren a la raíz de forma individual de manera rápida y reversible. Se ha comprobado que el flagelo polar tiene un papel importante ya que la eliminación de este por acción del calor o por tratamiento ácido, provoca una adsorción deficiente a raíces de trigo (Croes *et al.*, 1993). La fase de adsorción es seguida por una fase de anclaje en la que los agregados bacterianos se fijan firmemente y de forma irreversible a la raíz (fig. 1). Se ha

sugerido que el anclaje depende de la producción de polisacáridos extracelulares (Michiels *et al.*, 1991; Del Gallo *et al.*, 1994; De Troch, P. 1996; Skvortsov 1998)

Estos polisacáridos también han sido relacionados con el proceso de floculación de *Azospirillum* y es probable que sean similares al material fibrilar producido durante la asociación a la raíz (Skvortsov *et al.*, 1998; Burdman *et al.*, 1999). Se ha visto que hay otras sustancias involucradas en el proceso de colonización de la raíz, entre ellas están las lecitinas excretadas por la raíz o las WGA (wheat germ agglutinin) que actúan como moléculas señal en el proceso de asociación a la raíz de trigo además de inducir la fijación de N<sub>2</sub> excreción NH<sub>4</sub> y la producción de sustancias promotoras del crecimiento como AIA (Antonyuk *et al.*, 1993; Antonyuk *et al.*, 1995)

### **Producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal**

La capacidad de producción de fitohormonas esta ampliamente distribuida entre las bacterias que viven asociadas a las plantas y aproximadamente el 80% son productoras de auxinas (Bowen & Rovira, 1999). Se sabe que las diferentes especies de *Azospirillum* son capaces de producir tanto hormonas vegetales, incluido el etileno (Strzelczyk *et al.*, 1994) como poliaminas y aminoácidos (Thuler *et al.*, 2003; Bashan 1990-1996)

Una de las explicaciones al efecto de *Azospirillum* sobre la estimulación del crecimiento de las plantas es la producción de tales sustancias reguladoras del crecimiento. De estas sustancias, se han podido identificar tres tipos en sobrenadantes de cultivos de *Azospirillum*: auxinas, citoquinas y giberelinas. La fitohormona mas importante en términos cuantitativos producida por esta bacteria, es la auxina ácido 3-indol-acético (AIA). La producción de esta fitohormona por la bacteria, se asume que es la causante de los cambios detectados en el sistema radical tras la inoculación con *Azospirillum*, el cual se relaciona con la mayor absorción de nutrientes (Kapulnik, 1985; Okon, 1986; Fallik, 1994). Las rutas de síntesis del AIA en *Azospirillum* se detallan en profundidad en el capítulo 1.

### **3.4. Micorrizas arbusculares: su significado en Agricultura Sostenible**

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre ciertos hongos del suelo y la mayoría de las plantas que existen en la naturaleza. El hongo coloniza las raíces y posteriormente desarrolla una red de hifas externas que se extienden y ramifican en el suelo. Este micelio externo actúa como un sistema radical complementario, de extraordinaria importancia para la adquisición de nutrientes y agua para las plantas. Adicionalmente, las micorrizas confieren a las plantas una mayor capacidad de resistencia/tolerancia a los estreses ambientales. Por estas razones el uso racional de los hongos micorrícicos como inoculantes en agro- y ecosistemas puede representar una reducción sustancial de agroquímicos (fertilizantes y productos fitosanitarios etc.). Es por ello, que a las micorrizas se les reconoce un gran potencial en el contexto de la Agricultura Sostenible. Se ha

demostrado que las micorrizas están omnipresentes en todos los biomas y ecosistemas terrestres desde hace más de 400 millones de años, siendo la simbiosis microbio-planta más extendida en la naturaleza.

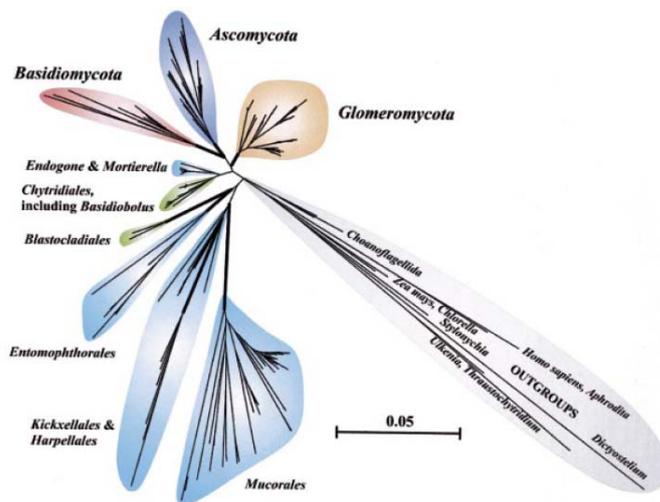
A continuación se hace un resumen de los aspectos más fundamentales sobre las micorrizas y sus funciones en el ecosistema, métodos de estudio e interacciones en la rizosfera. Esta información que no pretende ser exhaustiva, aunque se citan estudios de revisión recientes, y se concentra en los temas en los que incide esta Tesis Doctoral

**Micorrizas: Conceptos, tipos y funciones**

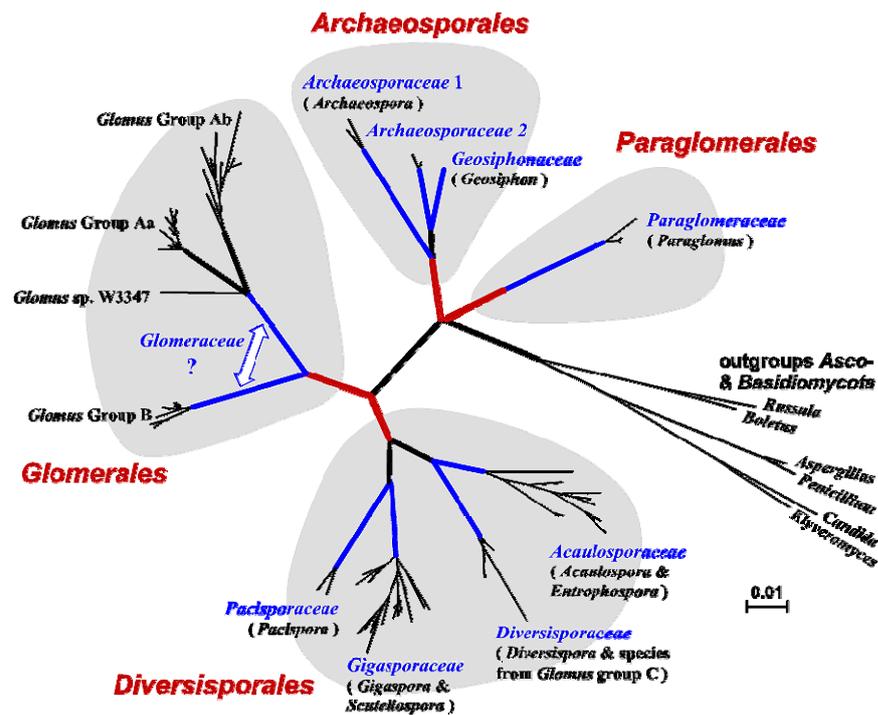
La inmensa mayoría de las plantas que crecen en los diversos ecosistemas terrestres forman algún tipo de simbiosis mutualista con hongos del suelo que colonizan la raíz, sin causar daño a la planta sino múltiples beneficios. Tal como se resume en la Tabla 1, se reconocen al menos cinco tipos diferentes de asociaciones micorrícicas, agrupadas en tres modalidades tróficas.

Se ha confirmado que el 95% de las especies vegetales existentes forman alguno de dichos grupos tróficos de micorrizas, aunque más del 80% de las especies forman las llamadas “micorrizas arbusculares” (Brundrett *et al.*, 1996; Smith & Read, 1997; Barea & Honrubia, 2004).

Las plantas y sus micorrizas tienen una historia evolutiva común ya que los registros fósiles de plantas más antiguos que se conocen presentan en sus primitivas raíces unas estructuras similares a las de las actuales micorrizas arbusculares. De acuerdo con ello, las micorrizas arbusculares tendrían una antigüedad de unos 400 millones de años, la misma que se le adjudica a las plantas, es decir, se originaron entre los periodos Silúrico y Devónico (Harley & Smith, 1983). Estudios recientes, que utilizan técnicas de biología molecular, han confirmado la validez de las apreciaciones anteriores sobre datación, filogenia y evolución de los hongos formadores de micorrizas arbusculares y su asociación con las plantas (Redecker *et al.*, 2000).



**Figura 1:** Filogenia de hongos MA



**Figura 2:** Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en las secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del ARNr. Tomado de Schüßler *et al.*, (2001). (B) Estructura taxonómica propuesta del phylum Glomeromycota en base a las secuencias de la SSU del ARNr.

El largo periodo de vida en común de los hongos y plantas simbiotes ha condicionado una co-evolución de ambos, que se manifiesta por el elevado grado de mutualismo y dependencia que los simbiotes muestran entre sí. Como consecuencia de tal co-evolución, la mayoría de las plantas son “micotróficas” por naturaleza, es decir, necesitan estar micorrizadas para adquirir nutrientes del suelo, mientras que el hongo, particularmente en el caso de las micorrizas arbusculares, es un “simbionte obligado”, es decir, solo completa su ciclo de vida cuando ha formado la micorriza con la planta (Azcón-Aguilar *et al.*, 1998).

Tipo de micorriza	Plantas implicadas	Hongos responsables
<b>Ectomicorriza</b>	Pinos, quercineas, hayas, abetos, abedules, sauces, olmos, etc. (fundamentalmente, plantas de interés forestal en zonas boreales y templadas)	Basidiomicetos, Ascomicetos
<b>Ectendomicorriza</b>	Madroño, cistaceas, etc.	Basidiomicetos, Ascomicetos
<b>Endomicorrizas</b>		
<b>Ericoides</b>	Ericales	Ascomicetos
<b>Orquidoides</b>	Orquidaceas	Basidiomicetos
<b>Arbusculares</b>	Más del 80% de las plantas existentes, incluidas herbáceas, arbustos y árboles de ecosistemas mediterráneos	Glomeromicetos microscópicos

**Tabla 1:** Principales tipos de micorrizas.

Los hongos micorrícicos se mantienen en el suelo en forma de esporas, redes de micelio, o colonizando raíces activas o fragmentos de estas que permanecen en el suelo. Estos son los propágulos capaces de iniciar la formación de una nueva micorriza. Cuando estos propágulos se activan producen un micelio mediante el cual el hongo contacta y coloniza la raíz, llegando a ser parte integrante de dicho órgano. Posteriormente, el hongo desarrolla un micelio externo que se extiende varios centímetros desde la superficie de la raíz y alcanza dimensiones de alrededor de un metro de hifas por centímetro de raíz micorrizada.

El proceso por el cual el hongo coloniza la raíz (tratado en profundidad a continuación) va a dar lugar a una estructura tridimensional que conecta la planta con los microhábitats del suelo, más eficaz que la propia raíz para extraer nutrientes y agua del mismo. El establecimiento de la micorriza da lugar a cambios en la fisiología de la planta hospedadora, lo cual permite que las plantas micorrizadas se desarrollen mejor y muestren un nivel de resistencia/tolerancia a los estreses ambientales (Jeffries *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2005a).

En resumen, y de acuerdo con la información recientemente revisada (Jeffries *et al.*, 2003; Lum & Hirsch, 2003; Rillig, 2004; van der Heijden, 2004; Govindarajulu *et al.*, 2005; Barea *et al.*, 2005a), las micorrizas realizan las siguientes acciones en los sistemas suelo-planta:

- **Mejoran el enraizamiento de las plantas**, actividad basada en la producción por los hongos de hormonas, vitaminas y otras sustancias fitoactivas.
- **Incrementan el suministro de nutrientes a las plantas**, efecto que deriva del protagonismo de los hongos micorrícicos en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes en el sistema suelo-planta.
- **Mejoran la estructura del suelo**, como consecuencia de la contribución de la micorriza en la formación de agregados estables y, por tanto, en la calidad del mismo.
- **Protegen a la planta frente a estreses bióticos y abióticos**, actividad con la que la simbiosis micorrícica contribuye a los procesos de control biológico de patógenos, o a incrementar la resistencia/tolerancia de las plantas a salinidad, sequía, estados de deficiencia en nutrientes, exceso de metales pesados, degradación del suelo, etc.
- **Favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal**, ya que cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrícicos, por lo que la conservación de la diversidad de estos hongos, beneficia la diversidad y sucesión de las plantas.

### **Ciclo de vida de los hongos MA.**

Antes de describir el ciclo vital de los hongos MA, es pertinente considerar que las MA tienen dos componentes claramente definidos y diferenciados. Uno de los componentes es la llamada “fase extrarradical” del hongo en la que se incluyen micelio externo, esporas y ocasionalmente, células auxiliares. El segundo componente es la denominada “fase Intrarradical” que incluye hifas intra e intercelulares, arbusculos y en algunas especies, vesículas. La colonización de la raíz solo ocurre en la epidermis y el parénquima cortical, ya que el hongo nunca llega a penetrar en el cilindro vascular ni las zonas meristemáticas (Bonfante-Fasolo, 1984).

El proceso de formación de la MA tiene lugar tras una sucesión de interacciones entre el hongo y la planta, en la que se va a producir una integración morfológica y funcional (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996) de ambos simbiontes. Como resultado, la planta “acepta” la colonización por parte del hongo sin mostrar una reacción de defensa persistente (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000). El establecimiento de la simbiosis es el resultado de un diálogo continuo y un esfuerzo mutuo para reconocer y aceptar las señales tanto de la planta como del hongo (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Vierheilig & Piché, 2002).

La colonización de la raíz se inicia a partir de esporas u otro tipo de propágulos tales como hifas o fragmentos de raíces colonizados procedentes de cultivos anteriores, siendo este tipo de propágulo de los más eficaces (Barea *et al.*, 1991).

El proceso de colonización a partir de esporas comienza por la germinación de esta. La espora desarrolla el tubo de germinación, proceso regulado por las condiciones físicas, químicas y fisicoquímicas del suelo (temperatura, pH, CO<sub>2</sub>, etc.) (Hepper 1981), así como la presencia de exudados radicales y de sustancias producidas por microorganismos (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986, Hildebrandt *et al.*, 2002). El micelio crece erráticamente hasta encontrar la rizosfera de la planta hospedadora, donde recibe las primeras “señales” de la planta, que el hongo acusa mediante una ramificación (estructura de “preinfección”). Si la hifa no encuentra una raíz para colonizar, comienza a tabicarse y a retraer el citoplasma hacia la espora quedando en un estado de reposo semejante al inicial (Azcón-Aguilar *et al.*, 1998; Bago *et al.* 1999). El proceso de germinación se repite hasta encontrar una raíz susceptible de ser colonizada.

Cuando la hifa encuentra la superficie radical, esta forma lo que se denomina apresorio, que consiste en un engrosamiento de la hifa sobre la superficie de la raíz (Barea *et al.*, 1991; Giovannetti *et al.*, 2000). El proceso de entrada, desde el contacto con la raíz hasta el inicio de la colonización se produce en un período de tiempo relativamente corto, 2-3 días (Becard & Fortín, 1988 1788). Para completar la colonización, la hifa de colonización ha de atravesar la epidermis mediante presión física y una leve actividad pectinasa y celulasa (García-Romera *et al.*, 1990; García-Romera *et al.*, 1991; García-Garrido *et al.*, 2002; Bonfante-Fasolo *et al.*, 1992). En la zona más externa de la corteza da lugar a unas estructuras intercelulares típicas llamadas ovillos o “coils”, formados por el enrollamiento de las hifas intracelulares. Se supone que la función de estos ovillos es la de obtener una adquisición rápida de compuestos hidrocarbonados procedentes de los exudados radicales de la raíz (Smith & Smith, 1997).

Poco después de la penetración inicial del hongo en la raíz (2-5 días), la hifa penetra en el interior de la célula vegetal pero nunca el plasmalema que se invagina alrededor del hongo. El hongo se ramifica dicotómicamente de forma repetida para dar lugar a la estructura más típica de la simbiosis: el arbusculo.

El arbusculo establecido dentro de la célula hospedadora queda envuelto por la membrana peri-arbuscular desarrollándose una matriz interfacial entre las dos membranas plasmáticas, la del hongo y la de la célula vegetal (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1986, 1992; Balestrini *et al.*, 1996; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Bonfante-Fasolo, 2001).

En esta interfase hongo-planta es donde se acepta que tiene lugar el flujo bidireccional de nutrientes entre la planta y el hongo (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1990). Normalmente los arbusculos tienen un tiempo de vida corto, de 4 a 10 días, después de los cuales degeneran y son digeridos por la célula hospedadora que vuelve a su función normal (Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1983; Bonfante-Fasolo, 1984; Alexander *et al.*, 1988).

Al mismo tiempo, o poco después que se formen los arbusculos, algunas especies de hongos MA forman vesículas intra y/o intercelulares (Abbott, 1982; Smith & Gianinazzi-Pearson 1988; Barea *et al.*, 1991). Las vesículas, son estructuras de forma diversa según la especie y de paredes finas, que se producen por el hinchamiento terminal o intercalar de las hifas. Estas estructuras almacenan

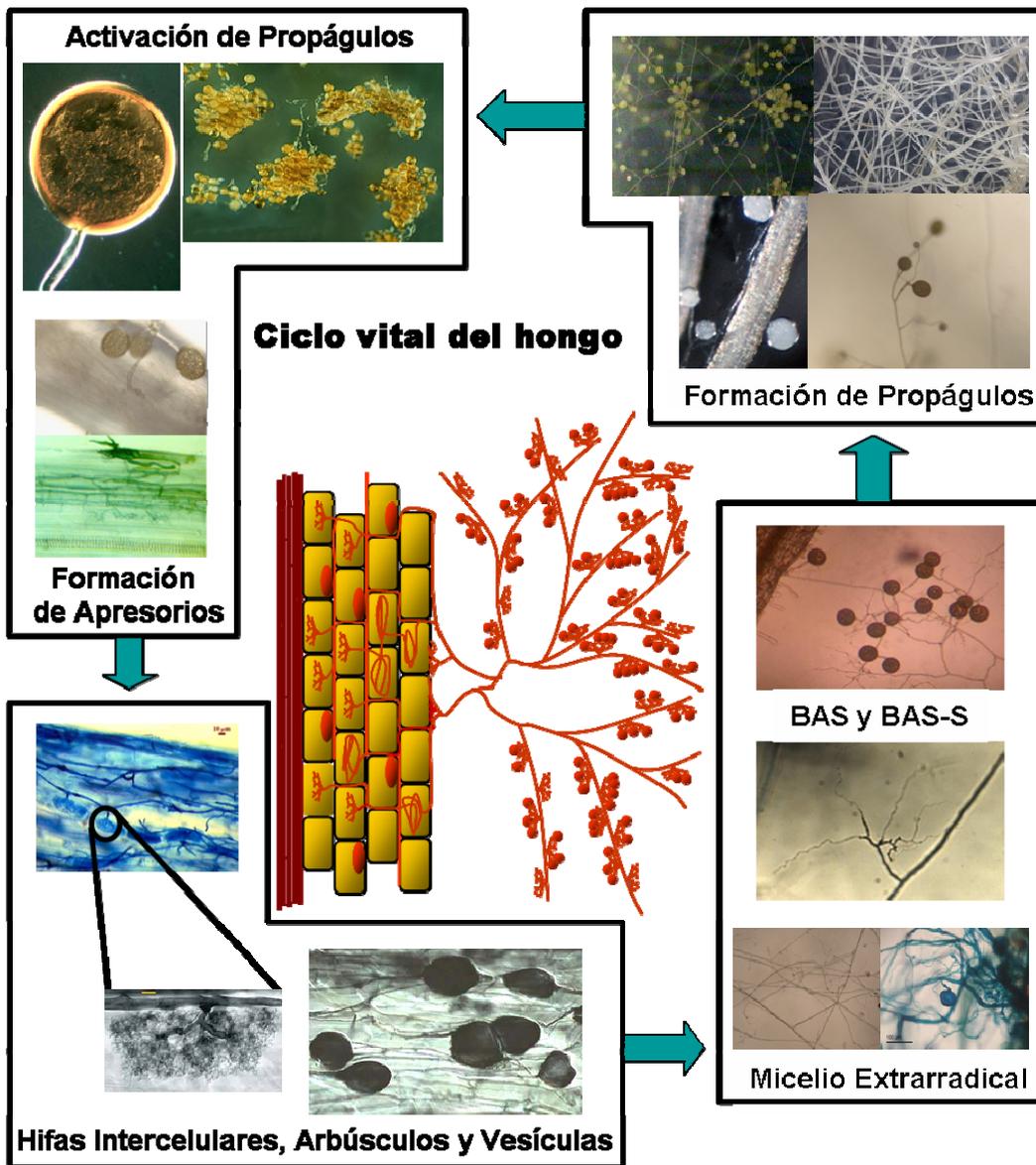
gran cantidad de lípidos y actúan como órgano de reserva del hongo. Ninguna de las especies pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* forman vesículas dentro de la raíz, aunque si producen células auxiliares en el micelio externo.

### **Crecimiento del hongo en el suelo**

A la vez que el hongo coloniza el sistema radical, se produce el desarrollo del micelio externo en el suelo que rodea a la raíz. Este es el que caracteriza la fase extrarradical de la simbiosis.

El hongo inicialmente genera unas hifas gruesas con una marcada apicalidad, denominadas hifas exploradoras. Estas hifas pueden sufrir una serie de ramificaciones y subramificaciones, que forman la red del micelio externo. A lo largo de su longitud, es posible encontrar estructuras muy ramificadas, conocidas como BAS (Branched Absorbing Structures), que serían zonas de absorción de nutrientes del suelo y que a veces aparecen asociados a esporas (BAS-spore) (Bago *et al.*, 1998a, 1998b; Bago, 2000).

Este micelio externo funciona como un sistema radical complementario que se extiende más allá de la zona de agotamiento en nutrientes cercana a la raíz. Su función es la búsqueda, absorción y transporte de nutrientes a la planta, especialmente aquellos de lenta difusión en la solución del suelo como son el fósforo, zinc, cobre y amonio (Sieverding, 1991 1616; Burkert & Robson, 1994 3298). Este extenso micelio externo que, a modo de sistema radical complementario y altamente efectivo se desarrolla, ayuda a la planta a adquirir los nutrientes minerales y agua del suelo. De hecho esta simbiosis se considera la parte metabólicamente mas activa de los órganos de absorción de nutrientes de las plantas. Además como ya se ha indicado anteriormente, el micelio juega un papel importante como fuente de inóculo para continuar la colonización en el mismo sistema radical o en algún otro próximo (Barea *et al.*, 1991).



**Figura 3:** Ciclo vital de los hongos MA. El ciclo comienza con la activación de los propágulos y estableciendo la fase intrarradical, a continuación sale de la raíz extendiendo el micelio extrarradical y formando BAS y BAS-S. En exterior se desarrollan los diferentes tipos de propágulos para comenzar un nuevo ciclo.

### Análisis de la diversidad de hongos micorrízicos en agrosistemas

La caracterización de los hongos formadores de micorrizas tiene especiales connotaciones en el caso de las micorrizas arbusculares (MA)

Al ser los hongos microscópicos formadores de las MA simbioses obligados (Azcón-Aguilar *et al.*, 1998) su caracterización, base de estudios de diversidad,

exige aproximaciones metodológicas muy especiales. Estos hongos se consideraban hasta hace poco incluidos en los zigomicetos, orden Glomales (Morton & Benny, 1990; Redecker *et al.*, 2000). Sin embargo, recientemente se les ha reubicado en un nuevo phylum Glomeromycota, erigido específicamente para ellos (Schüßler *et al.*, 2001a y b). La identificación de estos hongos se ha basado en las características morfológicas y en el desarrollo ontogénico de sus esporas multinucleadas (Morton & Benny, 1990; Azcón-Aguilar *et al.*, 2003b), estrategia que, aunque sigue siendo válida, tiene un uso limitado en estudios de diversidad, ya que puede no reflejar la plasticidad fisiológica y genética de sus poblaciones (Bachmann, 1998). Desde hace escasos años, el desarrollo de técnicas de biología molecular está posibilitando la utilización de criterios más constantes y fiables para caracterizar los hongos MA, facilitando así el subsiguiente análisis de la diversidad genética de las poblaciones (van Tuinen *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 1998; Redecker *et al.*, 2000; Kjoller & Rosendahl, 2000).

Debido a que el carácter de simbioses obligados de estos hongos limita la cantidad de material genético disponible para ser analizado, la aplicación de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un avance en la caracterización genética de los hongos MA. Concretamente, el análisis de los genes ribosómicos (ARNr) de los hongos MA ha puesto de manifiesto que el polimorfismo existente en dichos genes, especialmente en la pequeña subunidad ribosómica 18S, permite establecer criterios fiables para estudios de filogenia y diversidad (Daniell *et al.*, 2001; Schüßler *et al.*, 2001a y b; Clapp *et al.*, 2002; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2003; Öpik *et al.*, 2003; Ferrol *et al.*, 2004b; Calvente *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2004; Cornejo *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Mummey *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos los estudios genéticos sobre la estructura y diversidad de las poblaciones de estos hongos se han llevado a cabo utilizando las esporas aisladas del suelo, aunque se está avanzando en técnicas que amplifican secuencias de ADN/ARN de los hongos que están colonizando las raíces de las plantas (Clapp *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004; Cornejo *et al.*, 2004), obviamente una fracción de los existentes en el suelo en forma de esporas o micelio.

Los productos de la PCR se someten posteriormente a técnicas de “fingerprinting”, lo que permite obtener la “huella genética” del hongo. Las técnicas de “fingerprinting” más usadas son las conocidas por sus acrónimos SSCP, T-RLFP, ARDRA, RAPD, DGGE/TGGE/TTGE. Concretamente, en los últimos años se tiende al uso de T-RLFP -Terminal Restriction Fragment Polymorphism- (Johnson *et al.*, 2004; Mummey *et al.*, 2005), o la electroforesis en geles, bien DGGE -Denaturing Gradient Gel Electrophoresis- (Ma *et al.*, 2005) o bien TTGE -Temporal Temperature Gradient Electrophoresis- que preconiza el grupo de investigación autor de esta propuesta (Cornejo *et al.*, 2004). Estas estrategias innovadoras de ecología microbiana son la base para proceder a la secuenciación de los genes ribosómicos de las especies de hongos MA identificados lo que está permitiendo identificar los diferentes ecotipos de hongos formadores de micorrizas presentes tanto en una raíz colonizada, como en el suelo asociado a su rizosfera. En cualquier caso, y en lo que concierne a estudios de

diversidad, no hay que olvidar el concepto de diversidad funcional (van der Heijden *et al.*, 2004; Munkvold *et al.*, 2004) no necesariamente coincidente con el de diversidad taxonómica, y que se expresa mediante diferencias en eficacia funcional (por ejemplo capacidad para aportar P a la planta) de hongos que pertenecen al mismo taxón.

### **Interacción de los MA con microorganismos de la rizosfera**

Los hongos de la MA, como tales componentes de la microbiota del suelo, así como la propia simbiosis MA, están inmersos en diversos tipos de interacciones con microorganismos rizosféricos. El desarrollo, mecanismos implicados y resultado de estas interacciones han sido revisadas recientemente (Johansson *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2004 a & b; Barea *et al.*, 2005 a & b). En resumen, se puede concluir que tales interacciones se manifiestan por: (1) un efecto de determinadas bacterias que benefician la formación de las MA; (2) establecimiento de la llamada *micorrizosfera*, efecto derivado de los cambios que induce la formación de MA sobre la fisiología de la planta (lo que condiciona cambios cualitativos y cuantitativos en la liberación de exudados radicales), liberación de exudados por las propias hifas y creación de un nuevo espacio físico en el suelo colonizado por el micelio del hongo; y (3) el desarrollo de actividades cooperativas que afectan la nutrición y salud de la planta, así como la calidad del suelo. La Tabla 2 resume este tipo de interacciones y el resultado de las mismas.

Tipo de microorganismo	Resultado de la interacción
Bacterias fijadoras de N <sub>2</sub> ( <i>Rhizobium</i> , <i>Frankia</i> , etc.)	Incremento de la disponibilidad de N (biotertilizantes)
Solubilizadores de fosfatos ( <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , etc.)	Incremento en la disponibilidad de P (biofertilizantes)
Productores de fitohormonas ( <i>Azospirillum</i> , y otras PGPR)	Enraizamiento de plántulas (fitoestimularores)
Agentes de control biológico de enfermedades ( <i>Trichoderma</i> , <i>Gliocadium</i> , <i>Pseudomonas</i> ., etc)	Incremento de la tolerancia/resistencia a hongos y nematodos patógenos de la raíz ("biofungicidas", biocontrol)
Rizobacterias específicas	Biorremediación de suelos contaminados
Microorganismos relacionados con la formación de agregados	Mejora de la calidad física del suelo

**Tabla 2.-** Resultado de las interacciones de las MA con microorganismos beneficiosos

### 3.5. *Inoculantes bacterianos*

Teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de algunos componentes de la microbiota del suelo sobre el desarrollo y salud de las plantas, no es de extrañar que pronto se pensara en utilizar dichos microorganismos, tanto saprófitos como simbioses mutualistas, como base para la formulación de inoculantes (Bashan, 1998). La aplicación práctica comienza cuando en 1886, Hellriegel y Wilfarth, dos científicos alemanes, descubren la existencia de una relación simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias que se alojaban dentro de nódulos ubicados en las raíces. Una vez aisladas dichas bacterias, otros dos científicos alemanes (Nobbe & Hiltner, 1890), demuestran la ventaja de adicionar cultivos puros de estas bacterias al sembrar la semilla leguminosa. En este momento se registra Nitragin<sup>®</sup>, la primera patente de inóculo para plantas basado en *Rhizobium* sp. El uso de microorganismos saprófitos tales como *Azotobacter* en Rusia o *Bacillus megaterium* en la antigua Unión Soviética (Rubenchik, 1963; Macdonald, 1989) durante los años 30 y 40, produjo resultados poco concluyentes, lo que indujo al abandono de su uso. A mediados de los años 70 se producen dos fenómenos importantes en tecnología de inoculación, por un lado se observa que el género

*Azospirillum* mejora el crecimiento en plantas no leguminosas (Döbereiner & Day, 1976) actuando directamente sobre el metabolismo de la planta (Bashan & Holguin, 1997a, 1997b) y por otro, comienzan a estudiarse agentes de control biológico, en su mayoría pertenecientes a *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* (Defago *et al.*, 1992; Kloepper & Schrod, 1981; Glick, 1995; Glick & Bashan, 1997).

En los últimos años se han ensayado bacterias de los géneros *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acetobacter* y varios microorganismos relacionados con *Azospirillum* (Kloepper, 1994; Tang, 1994; Tang & Yang, 1997; Vivas *et al.*, 2003a). Debido a la versatilidad metabólica del género *Azospirillum* se han llevado a cabo estudios en los que se combina con otras bacterias del tipo PDB (del inglés, polysaccharide degrading bacteria) con las cuales interacciona de forma sinérgica. Las PDB aportan productos carbonados procedentes de su metabolismo mientras que *Azospirillum* a cambio cede N. Ejemplo de este tipo de inoculantes mixtos son los compuestos por *Azospirillum* junto con *Bacillus*, que degrada pectina, *Cellulomonas* que degrada celulosa o *Enterobacter cloacae* que fermenta glucosa (Kaiser, 1995; Khammas & Kaiser, 1992; Halsall, 1993). La coinoculación del género *Azospirillum* junto con bacterias solubilizadoras de P ha demostrado efectos benéficos sobre la planta así como un incremento en la nodulación en presencia de *Rhizobium*. A pesar de las ventajas aparentes que se observan en la coinoculación, se han comercializado muy pocas formulaciones mixtas, siendo los inóculos basados en un solo microorganismo los que más se producen. Ejemplos de estos son Soil implant<sup>®</sup>, Gold Coat<sup>®</sup>, Cell-Tech<sup>®</sup>, LIFT o Azogreen basado en *Azospirillum lipoferum* CRT1 (Fages, 1992) y empleado en la presente tesis doctoral.

A pesar del importante avance en la formulación y desarrollo de los inoculantes, la respuesta de los cultivos varía considerablemente. Ésta depende de multitud de factores entre los cuales destacan: el microorganismo (la bacteria), especie vegetal, tipo de suelo, densidad de inoculante, competitividad con otros microorganismos autóctonos del suelo y las condiciones medio ambientales. En general, al poco tiempo de introducir la bacteria en el suelo, la población disminuye rápidamente (Bashan & Levanony, 1988; Van Elsas *et al.*, 1986). Para que el microorganismo introducido sea efectivo, debe establecerse en un elevado número en la rizosfera de la planta inoculada y deberá mantener los niveles de colonización durante la fase en la que los microorganismos ejercen la acción para la cual fueron aplicados. Para que el microorganismo llegue en el mejor estado al momento su aplicación es esencial un sustrato que mantenga las características originales del inóculo el mayor tiempo posible.

Se ha avanzado mucho en la formulación de inoculantes pero no se puede hablar de un sustrato universal. Una característica común que todos deben cumplir es ser capaces de liberar el número adecuado de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento de la inoculación (Fages, 1990, 1992; Smith, 1992; Trevors *et al.*, 1992). Debido al bajo coste de algunos sustratos y su aceptable calidad

De momento y debido al alto coste que presenta el desarrollo de un “super-sustrato”, se viene empleando con buenos resultados turbas, carbón, arcillas, compost, vermiculita, perlita, alginatos o cultivos bacterianos liofilizados (Smith, 1995; Iswaran *et al.*, 1972. Aino *et al.*, 1997; Mohammadi, 1994 a y b)

El desarrollo de inoculantes microbianos como hemos visto anteriormente, se basa en el uso del mejor y más adecuado microorganismo para los cultivos diana. La búsqueda de mejores cepas bacterianas ha dado lugar al uso de nuevos productos biotecnológicos (Morrissey *et al.*, 2002). El desarrollo técnicas moleculares ha proporcionado las herramientas necesarias para la creación de cepas genéticamente modificadas, siendo múltiples las posibilidades a la hora de desarrollar un inoculante. Aprovechando el extenso conocimiento de la capacidad del género *Azospirillum* para producir sustancias fitoestimuladoras se ha propuesto el uso de esta bacteria para incrementar la producción natural de AIA mediante la incorporación de promotores delante del gen *ipdc*, encargado de la producción mayoritaria de dicha auxina (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Prensén *et al.*, 1993; Eckardt *et al.*, 2001).

En el presente trabajo, se han empleado dos plásmidos procedentes del cósmido pLAFR3 con múltiples sitios de clonación (Staskawicz *et al.*, 1987) y derivado de pLFAR1 (Friedman *et al.*, 1982), que resulta estable en multitud microorganismos rizosféricos, entre ellos, de *Azospirillum*. En el denominado pFAJ5002, el gen *ipdc* se encuentra clonado detrás del promotor constitutivo PnptII, mientras que en pFAJ5005, *ipdc* se encuentra clonado detrás del promotor inducible por la planta PsbpA (sugar binding Protein)(Els Van Bastelaere *et al.*, 1999).



## ***II. Material y Métodos***



## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Caracterización del suelo**

El suelo empleado procede de la finca experimental de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ, CSIC-Granada). Se trata de un suelo franco, que presenta las siguientes características: pH, 7,9; 2,1% de materia orgánica; 1.3g/l de N; 9mg/l de P; 82mg/l de K; 38% de arena; 43% de limo y 19% de arcilla. Para los experimentos en condiciones controladas el suelo se utilizó tamizado a 0.4cm de luz de malla, mezclado con arena de cuarzo lavada y estéril (4:1, v:v)

En los casos en los que se empleó un sustrato inerte, este consistió en una mezcla de sepiolita y arena (1:1, v:v).

### **2. Material vegetal**

Las plantas seleccionadas fueron Trigo (*Triticum aestivum*), variedad Rubino y maíz (*Zea mays*) variedad Girona, obtenidas a partir de semillas.

En los experimentos basados en cultivo monoxénico se utilizaron raíces de zanahoria (*Daucus carota*) DC2 transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, colonizadas por *G. intrarradices* (Bécard & Fortín, 1988), material suministrado por el Dr. A. Bago de la EEZ.

En los ensayos destinados a calcular el Número Mas Probable (NMP) de propágulos de MA se empleó *Sorgum bicolor* y para el aislamiento y multiplicación de hongos MA se emplearon *Trifolium repens* y *S. bicolor*

#### ***Obtención y cultivo de las plantas***

Se partió de semillas esterilizadas en superficie y posteriormente germinadas para su siembra en maceta.

Las semillas de trigo se hidrataron durante la noche y se trataron como se indica anteriormente. Se incubaron en placa Petri sobre papel de filtro estéril humedecido durante 4 días a 4°C.

En el caso del maíz previamente a la esterilización las semillas se lavaron repetidamente hasta la completa eliminación del fungicida que las cubría. Una vez limpias, se embebieron (hidrataron) en agua durante la noche y a continuación se esterilizaron en superficie según el protocolo descrito a continuación.

Se sumergieron en etanol 70% durante 1,30 seg. A continuación se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico 15% durante 10 min. Las semillas se lavaron tres veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril.

Salvo en los casos que se indican en el momento apropiado, los experimentos se realizaron en cámara de cultivo (Li-Cor, Lincon, NE, USA, modelo LL-18813)

con condiciones controladas. Concretamente, al 70-80% de humedad relativa, temperaturas de 25/15°C día/noche y un fotoperíodo de 16 h a una densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) de 400-500  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La determinación del NMP, se realizó en invernadero.

En una gran parte de los experimentos las plantas crecieron en suelo tinalizado. Para ello, el suelo se trata durante 1 hora en autoclave a vapor fluente durante 3 días consecutivos. De esta forma el suelo queda libre de propágulos de micorrizas. En los ensayos en que se usaban arena y sepiolita estos sustratos se esterilizaron en el autoclave a 120°C durante 20 minutos. Al sustrato inerte compuesto por arena:vermiculita estéril se adicionó 05g/l de fertilizante de liberación lenta (osmocote®).

### ***3. Características de los inoculantes de Azospirillum***

Los inoculantes usados para los ensayos corresponden a las cepas seleccionadas para llevar a cabo el proyecto ECO-SAFE. El tipo de inoculante, procedencia y características de las cepas utilizadas se exponen en la tabla 1.

Así mismo, se utilizó Azogreen, un inóculo comercial (Lipha, Meyzieu, France dirigido a cultivos de maíz. Este inoculante consiste en un soporte de turba preestéril e inoculado con un cultivo de *A. lipoferum* CRT1 (Jacoud *et al.*, 1998) aislado de raíces de maíz.

Especie/Cepa	Medio de Cultivo	Características	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp 245	LB*, YEP	Wild Type: Aislado de la superficie de raíces esterilizadas de trigo. Productor de AIA.	Baldani <i>et al.</i> , (1983)
<i>A. brasilense</i> Sp 245 Rif	LB*, YEP Rif 50	Wild Type: Aislado de la superficie de raíces esterilizadas de trigo. Productor de AIA. Resistencia espontánea a Rif.	J. Vanderlyden, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium
<i>A. brasilense</i> Sp245 (pFAJ5002)	LB* YEP Tc10	Derivado de <i>A. brasilense</i> Sp 245 con el gen <i>ipdC</i> clonado detrás del promotor constitutivo Pnpt II en el cósmido pLAFR3. Resistencia a Tetraciclina 10µl/ml	
<i>A. brasilense</i> Sp245 (pFAJ5005)	LB* YEP Tc10	Derivado de <i>A. brasilense</i> Sp 245 con el gen <i>ipdC</i> clonado detrás del promotor inducible por la planta <i>psbPA</i> en el cósmido pLAFR3. Tc <sup>r</sup>	
<i>A. brasilense</i> Sp245 (pFAJ0535)	LB* YEP Tc10	Derivado de <i>A. brasilense</i> pFAJ5005 que contiene el gen <i>eyfp</i>	
<i>A. brasilense</i> Sp245-41	LB* YEP Tc10 Rif50	Derivado de <i>A. brasilense</i> Sp 245 que contiene el plásmido pMP4641 ECFP	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> Sp245-55	LB* YEP Tc10 Rif50	Derivado de <i>A. brasilense</i> Sp 245 que contiene el plásmido pMP4655 EGFP	
<i>A. brasilense</i> Sp245-58	LB* YEP Tc10 Rif50	Derivado de <i>A. brasilense</i> Sp 245 que contiene el plásmido pMP4658 EYFP	
<i>A. lipoferum</i> CRT1	LB* YEP	Wild Type. Azogreen®. Inoculante comercial sobre turba estéril. 10 <sup>7</sup> ucf/g. Biofertilizante y fitoestimulador.	Fages & Mulard, (1988) Jacoud <i>et al.</i> , (1998) Lipha Meyzieu, France

**Tabla 1:** Cepas de *Azospirillum* empleadas en los experimentos. Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tc)

Otras cepas bacterianas empleadas para desarrollar diversos estudios que después se detallan en la tabla 2. Estas consisten en diversas cepas de *E. coli* que contienen las características necesarias para la transformación con los vectores de ligación como para la conjugación triparenteral con *Azospirillum*. Los plásmidos (pMP46) que portan, confieren las características necesarias para la expresión de proteínas derivadas de GFP (green fluorescent protein)

Especie/Cepa	Medio de cultivo	Características	Referencia
E. coli DH5 $\alpha$	LB, Amp100 X-gal IPTG	Usado para la transformación y multiplicación de plásmidos	Hanahan, 1983
E. coli pRK2013	LB Km25	Contiene el plasmido derivado del HB101, plasmido auxiliar para movilización de plásmidos	Ditta <i>et al.</i> , 1980
E. coli pMP4641	LB Tc10	Plasmido pME6010 que contiene el gen <i>ecfp</i>	Heeb et al, 2000; Bloemberg <i>et al.</i> , 2000,
E. coli pMP4655	LB Tc10	Plasmido pME6010 que contiene el gen <i>egfp</i>	
E. coli pMP4658	LB Tc10	Plasmido pME6010 que contiene el gen <i>eyfp</i>	
E. coli pMP4662	LB Tc10	Plasmido pME6010 que contiene el gen <i>DsRed</i>	

**Tabla 2:** Cepas de *E. coli* y plásmidos empleados.

#### 4. Preparación de inóculos e inoculación de bacterias:

Los inóculos se prepararon creciendo *A. brasilense* Sp245 o sus derivados en LB suplementado con 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> y 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, adicionado con los antibióticos necesarios en cada caso a 28°C. Los cultivos se lavaron en dos veces con tampón fosfato (PBS) y se resuspendieron hasta alcanzar una D.O.595 correspondiente a 10<sup>9</sup> UFC/ml.

##### ***Inoculación de semillas pregerminadas***

Este inóculo se diluyó en agua hasta obtener una concentración de 10<sup>7</sup> UFC/ml. Se inocularon 100µl por semilla pregerminada. En el caso del inóculo Azogreen, se realizó una suspensión líquida equivalente a 10<sup>6</sup> UFC/ml. Se inoculó 1ml de esta suspensión por semilla pregerminada. En todos los casos el inóculo se realizó a lo largo de la raíz una vez colocada en el hoyo de plantación a 1cm de la superficie del sustrato y posteriormente se cubrió con el sustrato correspondiente.

##### ***Inoculación de cultivos monoxénicos***

El cultivo monoxénico de *G. intrarradices* ya establecido se inoculó con las bacterias según se describe a continuación.

Los cultivos bacterianos se crecieron como se ha descrito anteriormente haciendo especial hincapié en el lavado de las células para eliminar por completo las posibles trazas de antibiótico.

Se inoculó 1ml de un inóculo de  $10^4$  UFC (*A. brasilense* Sp 245; Sp 245-41; Sp 245-58 y Sp245 (pFAJ0535)) en la superficie de la placa y se extendió cuidadosamente para no romper ni el micelio externo ni perforar la superficie de la placa. En el caso de inocular las bacterias pFAJ0535 y Sp245-41 conjuntamente, se inocularon 500µl de cada una de la forma descrita anteriormente. Se observó que *A. brasilense* prácticamente no crece en medio M, sin embargo, se desarrollaba lentamente alrededor de las hifas y raíces de zanahoria. Las placas inoculadas se mantuvieron a 24°C hasta su visualización al microscopio.

## 5. Medios de cultivo

### ***LB (Luria Bertani)***

1% Triptona  
0.5% Extracto de levadura  
1% ClNa  
Agua destilada c.s.p. 1000ml  
Ajustar el pH a 7 con NaOH  
Esterilización al autoclave a 120 °C durante 20 minutos.  
Para el cultivo de las cepas de *Azospirillum*, el medio LB\* se suplementó con 2.5mM MgSO<sub>4</sub> y 2.5mM Cl<sub>2</sub>Ca filtrado.

### ***YEP (Extracto de levadura peptona)***

1% Bactopeptona  
0.5% Extracto de levadura  
1% ClNa  
Agua destilada c.s.p. 1000ml  
Ajustar el pH a 7 con NaOH  
Esterilización al autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

### ***MMAB (Medio Mínimo malato)***

3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1% NH<sub>4</sub>Cl  
0.03% MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O  
0.015% KCl  
0.001% CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O  
0.00025% FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

5% malato sódico  
0.0005% biotina  
Microelementos.  
Agua destilada c.s.p. 1000ml (Vanstockem *et al.*,1987).

### ***NFB (Nitrogen Free malate)***

0.5% Ácido L-malico  
0.05%  $K_2HPO_4$   
0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0.01% NaCl  
0.002%  $CaCl_2$   
0.0002%  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$   
0.001%  $MnSO_4 \cdot H_2O$   
4ml Fe-EDTA(1.64% w/v en agua)  
3ml Azul de Bromothymol (0.5% p/v en etanol)  
0.45% KOH  
0.1‰ Biotina  
Agua destilada c.s.p. 1000ml  
Ajustar el pH a 6.8 (color verde) con NaOH.

### ***M9 (Medio Mínimo)***

Empleado para la obtención de exudados radicales

6g  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$   
3 g  $KH_2PO_4$   
1 g  $NH_4Cl$   
0.5 g NaCl  
0.25 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0.0147 g  $CaCl_2 \cdot H_2O$   
Esterilizado por filtración  
Agua destilada c.s.p. 1000ml  
El medio se suplementa con 0.1% glucosa, y se ajusta el pH a 6.8

### ***MES***

El medio se basa en el utilizado por Carr & Hinkley (1985), y fue empleado para los experimentos de germinación *in vitro* de esporas de MA en placas de 90mm de diámetro con 20ml de medio por placa.

La composición del medio fue al 0.8% de agar en solución 10mM MES a pH 7.0.

0.195g MES (ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico)  
0.876ml NaOH 1M  
0.124ml NaCl 1M  
H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. 100ml  
Una vez preparado el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

### ***Medio M***

Este medio se utiliza para cultivo monoxénico de hongos micorrícicos (Chabot *et al.*, 1992)

1.21 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
21.8 mM NaFe/EDTA  
4.51 μM KI  
10% Solución de Macroelementos  
0.1% Solución de Microelementos  
1% Vitaminas  
1% Sacarosa  
0.35% Phytigel

El pH se ajustó a 5.5 con NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

**Solución de Macroelementos:** 30mM MgSO<sub>4</sub>, 7.9mM KNO<sub>3</sub>, 8.7mM KCl, 0.35mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14mM NaSO<sub>4</sub>

**Solución de Microelementos:** 30mM MnCl<sub>2</sub>, 9.3mM ZnSO<sub>4</sub>, 24.2mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5mM CuSO<sub>4</sub>, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>

**Vitaminas (100x):** 4mM glicina, 29.6μM Hidrocloruro de tiamina, 49μM hidrocloruro de piridoxina, 0.4mM ácido nicotínico, 27.7mM mio-inositol.

Este medio de cultivo se dispone en placas bicompartimentadas. En una de las secciones crecen las raíces cuyo medio es completo, mientras que el otro compartimento el medio carece de fuente carbonada (M-C) y es donde el hongo esporula.

### ***Exudados radicales***

La planta seleccionada para obtener los exudados radicales fue maíz. Para ello se esterilizaron las semillas según el siguiente protocolo.

Las semillas se lavaron varias veces con agua hasta la completa eliminación del fungicida y se dejaron hidratando durante la noche, en agitación.

Sumergir en etanol 96% durante 30seg.  
 Sumergir en lejía 1.5% Tween 20 durante 1.30h.  
 Lavar tres veces con H2O destilada estéril.  
 Sumergir en lejía 1.5% durante 1h.  
 Lavar tres veces con agua destilada estéril.

Se sembraron 4 semillas en cada placa con medio MS suplementado con 0.5% glucosa y 0.2% de phytigel. Se incubaron hasta la germinación de las semillas y se seleccionaron aquellas placas en las que no se observó contaminación.

En dos contenedores estériles con 200ml de medio M9 se colocaron 10 semillas germinadas en cada uno y las raíces se sumergieron en la solución. Se dejaron crecer durante 10 días a 25°C. El medio se recogió de forma aséptica y se comprobó la esterilidad del medio sembrando 100µl en placa Petri con LB.

### ***Solución nutritiva (Hewitt, 1966)***

Solución nutritiva modificada a partir de Hewitt (1966) es la siguiente.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (µM)</b>	<b>Solución stock (g/l)</b>	<b>Para 1l (ml)</b>
KNO <sub>3</sub>	3 x 10 <sup>3</sup>	30,3	10
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9 x 10 <sup>3</sup>	101,54	20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	300	18,4	2,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	150	18,4	20
EDTA Fe	67	2,45	10
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	13	1,35	1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1	2,4	0,1
ZnSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1	4,22	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30	18,6	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15	0,35	0,1

### ***Solución Ringers***

0.85% NaCl  
 0.03% CaCl<sub>2</sub>  
 0.025% KCl  
 0.02% NaHCO<sub>3</sub>

## 6. Hongos Micorrícicos

En diversos ensayos no se practico inoculación de hongos MA sino que se utilizó suelo natural sin esterilizar, es decir que contenía todos los propágulos micorrícicos presentes en la parcela experimental. Como posteriormente se detalla, entre las especies representes en ese suelo fueron se encontró *Glomus mosseae*, *Glomus caledonium* y *Glomus lamellosum*

Para el ensayo de germinación de esporas, se emplearon los *G. mosseae* y *G. lamellosum* así como un *G. geosporum* EEZ 4 (Sierra de los Filabres, Almería). Para el ensayo basado en cultivo monoxénico se utilizó *G. intrarradices* simbionte con raíces de zanahoria.

### 6.1. Extracción de esporas de hongos MA del suelo

Se emplea una modificación de la técnica del tamizado húmedo y decantación mediante gradientes de sacarosa (Walker *et al.*, 1982).

Se homogeneizaron 50-100g de suelo con 100 ml de agua destilada y tras una centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos se eliminó el sobrenadante. De nuevo se homogeneizó con una solución de sacarosa al 50% y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Esta vez el sobrenadante se filtró a través de tamices con una luz de malla de 80 y 50  $\mu\text{m}$  y el tamizado se recogió con agua. Las muestras se visualizaron con la ayuda de un estereoscopio y las esporas obtenidas se agruparon de acuerdo a características morfológicas.

La extracción de esporocarpos se realizó tras la homogeneización del suelo en agua y dejando reposar la mezcla durante un minuto. A continuación se filtró a través de un tamiz de 80  $\mu\text{m}$ . Para extraer las esporas de los esporocarpos, estos se dispusieron sobre un papel de filtro húmedo y con la ayuda de pinzas finas y aguja se rompieron para liberar las esporas.

### 6.2. Identificación morfológica de esporas de hongos MA

(Koske & Tessier, 1983; Morton, 1991)

Las esporas se observaron en el estereomicroscopio (de 0.25x a 4x) y separaron en función de su tamaño, morfología y color. Para su observación al microscopio óptico (de 10x a 40x) las esporas se dispusieron en portaobjetos inmersas en dos medios de conservación como son el alcohol polivinílico-ácido láctico glicerol (PVLG) y el de Meltzer-PVLG en proporción 1:1 (v:v).

La observación al microscopio óptico permite determinar el número de capas que presentan las paredes de las esporas, las características de las mismas (color, reacción en presencia del reactivo de Meltzer, etc...), morfología de la hifa de sustentación, presencia o ausencia de sáculo esporogénico, cicatrices, etc..., características todas ellas importantes para la identificación de los hongos MA.

**PVLG**

Alcohol de polivinilo (APV) 1,66 g, Ácido láctico 10 ml, Glicerina 1 ml, Agua destilada c.s.p. 10 ml

**Reactivo de Meltzer**

Ioduro potásico 1,5 g, Yodo 0,5 g, Hidrato de Cloral 100 g, Agua destilada c.s.p. 22 ml

### 6.3. *Producción de inóculos puros de hongos micorrícicos*

Para la multiplicación de los hongos MA se utilizaron *Sorghum bicolor* y *Trifolium repens* como plantas hospedadoras. Como sustrato de crecimiento se empleó una mezcla arena:sepiolita (1:1, v:v) estéril. Las plántulas se inocularon con las esporas de cada uno de los morfotipos aislados y se dejaron crecer bajo condiciones de invernadero durante 4-6 meses. Tras este tiempo se aislaron esporas de sustrato (protocolo 6.1) y en el caso de encontrar tipos diferentes de las mismas se volvió a repetir el proceso hasta obtener un solo tipo de esporas y por tanto un inóculo puro.

### 6.4. *Estimación del potencial micorrícico del suelo*

Se empleó el Método del Número Más Probable (NMP) (Sieverding, 1991). La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de los microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. El atributo particular a utilizar en nuestro caso, ha sido la capacidad de los hongos MA de colonizar las raíces de las plantas. Para la realización de la técnica del NMP se realizaron diluciones seriadas del suelo ó inóculo a estudiar. Éste se mezcló con un sustrato estéril constituido por suelo:arena:vermiculita (1:1:1; v:v) y se utilizó sorgo como planta hospedadora debido a su elevada micotrofia. Al cabo de 4 semanas las raíces del sorgo se tiñeron y se determinó si estaban o no micorrizadas.

Cálculo del Número Más Probable:

$$\text{Log } \Omega = x \text{ Log } a - K$$

**Ω:** Número de propágulos infectivos x: número medio de plantas colonizadas

**a:** factor de dilución

**y:**  $y = s - x$

**s:** número de niveles de dilución

**K:** constante presente en la tabla VIII de Fisher & Yates (1970) obtenida a partir de los valores determinados de x o de y.

- Se prepararon 5 repeticiones por cada dilución de suelo o inóculo.

### **6.5. Tinción de raíces micorrizadas**

Se seleccionaron fracciones representativas de cada uno de los sistemas radicales, mediante el proceso de clarificación y tinción descrito por Philips y Hayman (1970) y basado en el uso de azul tripán. El colorante azul tripán tiñe las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de algunos hongos, entre ellos los formadores de MA (Bartnicki-García, 1968). Se observan así los componentes del hongo en el interior de la raíz, sin que ésta se coloree. Para ello, las raíces se trataron con una solución de KOH al 10% (10 min., 100°C) para proceder a la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares. Después de varios lavados con agua, se aplica una solución 0.1N de HCl (5 min., a T<sup>a</sup> ambiente) que actúa como neutralizadora y mordiente para el siguiente paso, la tinción que se lleva a cabo con azul tripán durante 15 min., en caliente. El colorante se une a la quitina de la pared fúngica, tiñéndose las estructuras del hongo de color azul.

Solución de azul-tripán en ácido láctico al 0,05 % (p/v).

### **6.6. Determinación del porcentaje de micorrización**

Una vez teñidas las raíces, se montaron fragmentos de raíz de aproximadamente 1cm. de longitud en portaobjetos, se añadieron unas gotas de ácido láctico y se cubrieron con un cubreobjetos (20 fragmentos en cada portaobjetos y 3 portaobjetos por cada muestra). La colonización de la raíz se cuantificó al microscopio óptico, determinando el porcentaje de corteza radical ocupada por el hongo.

La cuantificación de la colonización micorrízica, se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio óptico. Para ello se asignaron a cada trozo de raíz dos valores. El primero de ellos corresponde a la longitud de fragmento que está colonizada, y el segundo a la intensidad de dicha colonización. Estos números toman el valor 0 cuando no hay colonización y 10 cuando ésta es máxima. La multiplicación de estos dos valores da el porcentaje de micorrización presente en cada fragmento de raíz, y la media de todos ellos da una estimación del grado de micorrización de la planta. De cada planta de trigo o maíz se examinaron tres portaobjetos con aproximadamente 20 fragmentos de raíz cada uno.

## **7. Caracterización molecular de los hongos micorrízicos**

Se llevó a cabo en base al análisis de la subunidad pequeña (18S) del ADN ribosómico (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001).

Se utilizaron de 1 a 5 esporas de cada uno de los hongos micorrízicos aislados de la parcela de la EEZ.

De acuerdo con el Protocolo 6.1 se recogieron esporas de los distintos endofitos. Sobre un portaobjetos limpio y tratado con 10 µl de Bind Silane (crea una película hidrofóbica que favorece la posterior recuperación del agua con los el

contenido de la espora), se colocaron de 1 a 5 esporas sobre 10  $\mu\text{l}$  de agua para PCR. Con ayuda de una aguja estéril y bajo el estereomicroscopio se rompió la pared de las esporas. Para amplificar la zona 18s de ADN ribosómico, se utilizaron los cebadores NS31 y AM1, cebador universal y específico de los hongos MA respectivamente.

### **7.1. Amplificación de ADN de esporas por PCR**

Para la amplificación de hongos MA a partir de esporas, la mezcla de reacción empleada contenía 10  $\mu\text{l}$  del extracto de ADN, 1  $\mu\text{l}$  de cada cebador (25  $\mu\text{M}$ ) y una bola de PureTaq<sup>TM</sup> Ready To-Go PCR beads (Amershan), que contenía todos los elementos necesarios para realizar la PCR en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . El programa de PCR se describe en la tabla X

### **7.2. Amplificación de Endofitos en Raíces**

Para dicha amplificación por PCR se realizaron los siguientes pasos descritos a continuación.

#### **7.2.1. Extracción de ADN de raíces**

Una vez cortada la parte aérea, la raíz se extrajo con cuidado de la maceta. La raíz se lavó y secó para determinar el peso fresco. Se cortó una alícuota de la parte central de la raíz e inmediatamente se sumergió en nitrógeno líquido y se mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El ADN genómico de raíces micorrizadas se extrajo a partir de alícuotas de 0.1g de material vegetal con el kit DNeasy Plant Mini Extraction Kit (Qiagen).

La amplificación de los hongos MA presentes en las muestras de raíz, se realizó mediante la técnica de PCR nidada, en la que se usa como molde un fragmento anteriormente amplificado por PCR.

El ADN extraído se amplificó mediante PCR con 1  $\mu\text{l}$  de los cebadores NS31 (universal) y AM1 (específico de Glomales) a una concentración 10  $\mu\text{M}$ , usando PureTaq<sup>TM</sup> Ready To-Go PCR beads. El programa de amplificación de la PCR se muestra en la tabla 3. El producto de PCR obtenido, de unos 550pb, se comprobó en un gel de agarosa 1.2% y se eluyó la banda de tamaño esperado usando el kit QuiaEx (QuiaGen). El ADN recuperado se utilizó para la PCR nidada con 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de los cebadores Inglo2 y NS31-GC 25  $\mu\text{M}$  y usando la enzima Taq Master Mix (Eppendorf) en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  (el programa de amplificación de la PCR se muestra en la tabla 3. El fragmento de unos 270pb amplificado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2%. Dependiendo de la amplificación observada, se cargó en el gel TTGE un volumen de entre 4 y 8  $\mu\text{l}$  de dicho producto de PCR.

Cebadores	Programa	Uso
<b>Hongos MA</b>		
AM1/NS31	95°-10' (95°-1'-56°-1'-72°-2') x28- 72°-10'	PCR TGGE
NS31-GC/Inglo2	95°-10' (95°-1'-53°-1'-72°-1'30) x30 72°-10'	PCR nidada TGGE
NS31-Inglo2	95°-5' (95°-1'-53°-1'-72°-1'30) x30 72°-10'	Reamplificación banda eluida TGGE
<b>Generales</b>		
M13F/M13R	Programa estándar PCR	Amplificación clones
27F/1495R	Programa estándar PCR	Procariotas Subunidad 16s
Bac-1522-b-S/ Bac132-a-A	94°- 3' (94°-1'-55°-30''- 72°-1') x25 72°-5'	Región IGS del operón <i>rrn</i>
<b>Específicos de <i>Azospirillum</i></b>		
Azo238/ Azo239r (pFAJ5002)		<i>PnptII-ipdC</i> en pFAJ5002
Azo211f/ Dpipdc2AS (pFAJ5005)	94°- 7' (94°-1'-56°-1'-72°-2') x35 72°-7'	Promotor <i>sbpA</i> y gen <i>ipdC</i> completo en pFAJ5005
Azo211f/Azo239r (pFAJ5005)		Promotor <i>sbpA</i> y gen <i>ipdC</i> completo en pFAJ5005
VKnpt01f/ VKnpt02r (pFAJ5002)		promotor <i>PnptII</i>
Azo238/Vknpt02		promotor <i>PnptII</i>

**Tabla 3:** Programas de PCR empleados para las diferentes amplificaciones

### 7.2.2. Visualización de ADN mediante separación electroforética en geles de agarosa

La separación electroforética del ADN se realizó en geles de agarosa al 1.2% en tampón TBE. La electroforesis se realizó en tampón TBE a 100V. Para cargar las muestras de ADN se empleó tampón de carga a una concentración final 1x.

Para la visualización del ADN, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV (260nm).

Tampón de carga (5x): 0,25 % (p/v) Azul de bromofenol y 40% (p/v) sacarosa

TBE (5x) : 54 g Tris base, 20 ml 0,5M EDTA pH= 8,0 y 27,5 g Ácido Bórico H<sub>2</sub>O destilada. c.s.p. 11

### 7.2.3. Separación de fragmentos de ADN mediante TTGE

Una vez obtenidos los “amplicones” de ADN es preciso identificar los distintos fragmentos, de igual longitud pero de distinta secuencia nucleotídica, específica de especie de hongo MA. Esto se efectúa por técnicas de “fingerprinting”. Se han desarrollado varias técnicas basadas en amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR) (Lanfranco *et al.*, 1995), Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003) para la identificación de especies. Actualmente se ha puesto de manifiesto la enorme utilidad de técnicas basadas en la separación de fragmentos amplificados por PCR con cebadores específicos diseñados para la identificación de hongos MA del mismo tamaño pero que difieren en su secuencia nucleotídica. Estos métodos incluyen diferentes técnicas electroforéticas como Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) (Kjøller & Rosendahl, (2000), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Kowalchuk *et al.*, 2002; Öpik *et al.*, 2003) o temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) (Bosshard *et al.*, 2000; Ogieret *et al.*, 2002; Cornejo *et al.*, 2004)

El TTGE es una técnica que funciona bajo el mismo principio que el DGGE pero con la salvedad de no necesitar el gradiente químico como agente desnaturizante, por lo que los datos son más reproducibles (Yoshino *et al.*, 1991).

Los fragmentos de DNA se someten a una desnaturalización, en la que se detectan cambios de movilidad en los fragmentos al migrar en un gel de poliacrilamida. Cada uno de los fragmentos alcanza una temperatura de disociación denominada temperatura de “melting” ( $T_m$ ) y es específica de la secuencia. En este punto el ADN está parcialmente disociado, creando moléculas ramificadas que reducen la migración del ADN en el gel de poliacrilamida haciendo posible la separación de fragmentos con diferente composición de bases.

Para determinar el rango de temperatura al cual se corrieron los geles, se seleccionaron las secuencias de 20 hongos micorrícicos de la región amplificada con los cebadores del 18s del rADN. Mediante el programa WinMelt Version 2.0.13 (Bio-Rad Laboratories) se calculó la temperatura teórica de desnaturalización de cada una de ellas. Debido a que con la pareja de cebadores AM1-NS31-GC no es posible la discriminación entre especies sino que solamente a nivel género (Öpik *et al.*, 2003, Cornejo *et al.*, 2004), se diseñó el cebador Inglo2 que amplificaba una región menos conservada. Según las secuencias del fragmento amplificado el programa WinMelt predijo un rango de temperatura de 52-59°C para un gel de urea 7M con un incremento de 1°C/h a un voltaje constante de 130 v en Buffer TAE 1.5x (Cornejo *et al.*, 2004).

La separación de los fragmentos amplificados por PCR de las raíces colonizadas, se realizó mediante geles de acrilamida por la técnica TTGE

(Electroforesis en geles de gradiente de temperatura). Para la electroforesis se empleó el sistema DCode System for TTGE (Biorad)

La separación de los fragmentos amplificados, se realizó en geles de poliacrilamida al 8% con una concentración de urea 8M. Los geles se sometieron a una rampa de temperatura de 52-59°C con un incremento de 1°C/h a un voltaje constante de 130 v en Buffer TAE 1.5x.

Composición Gel al 8%	
40% Acrilamida	7.77ml
2% Bisacrilamida	4.29ml
50x TAE	1.2ml
Urea	16.8g
TEMED	40µl
10% APS	400µl
H <sub>2</sub> O c.s.p.	40ml

**Tabla 4:** composición de geles de poliacrilamida para TTGE

#### ***7.2.4. Extracción de ADN a partir de geles de poliacrilamida***

Las bandas seleccionadas se extrajeron cortandolas con un bisturí estéril. Se introdujeron en un eppendorf con 50ml de TE. Las bandas extraídas se tituraron con un pistilo estéril. Los tubos se incubaron a 37° C durante la noche. A continuación se realizaron dos ciclos donde se mantuvieron a -20° C durante 2h. y posteriormente se incubaron a 67° C durante 2h. Este ciclo se repitió dos veces. Los eppendorf de centrifugaron a 1min a 14000 rpm. Para la reamplificación de las bandas se empleó 1ml de este sobrenadante.

#### ***7.2.5. Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa***

Las bandas del tamaño esperado, se cortaron con un bisturí estéril bajo la iluminación de la lámpara UV y se eluyeron con el kit comercial QiaexII Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### ***7.2.6. Ligación en vectores de clonación***

La ligación de los productos de PCR purificados con el vector de clonación se realizó usando una proporción de 3:1 de los vectores de clonación pGEM-T Easy (Promega) y TOPO TA Cloning de Invitrogene.

En un tubo eppendorf de 0.5 ml se incubó durante la noche la siguiente mezcla de reacción según las instrucciones del fabricante:

### **PGEM-T Easy Vector**

X µl Inserto  
1 µl Ligasa  
1 µl Vector (50ng/µl)  
X+2 µl Tampón (2x)

### **TOPO TA Cloning**

Inserto de 0.5 a 4 µl  
Salt Solution 1 µl  
TOPO<sup>®</sup> Vector 1 µl  
H<sub>2</sub>O c.s.p. 6 µl  
Incubar O.N. a 14°C

### **7.2.7. Preparación de células competentes de *E.coli***

La preparación de las células competentes se realizó según la metodología descrita por Hanahan (1983)

1. Se inocularon 2ml de un preinóculo en 50ml de LB suplementado con 10mM de MgSO<sub>4</sub>
2. Se incubó a 37°C en agitación constante hasta que se alcanzó una densidad óptica de D.O<sub>600</sub>=0.5 (aproximadamente 1-2 h).
3. El cultivo se distribuyó en tubos de centrifuga de 25mL y se enfriaron en hielo durante 15min.
4. Las bacterias centrifugaron a 750xg durante 12min a 4°C, eliminando el sobrenadante y secando las paredes de los tubos.
5. Las bacterias se resuspendieron en 16mL de la solución RFI y se incubaron durante 15 minutos en hielo.
6. Se centrifugó nuevamente como en el paso 4, y se resuspendió en 2mL de solución RFII.
7. Los tubos se incubaron durante 15 minutos en hielo.
8. Se prepararon alícuotas de 100mL, las cuales se introdujeron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Todo el material empleado en este protocolo ha de estar frío

---

**RFI:** RbCl 100mM; MnCl<sub>2</sub> 50mM; acetato potásico 10mM; CaCl<sub>2</sub> 10mM; Glicerol 11.9 % p/v; Ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M y esterilizar por filtración.

**RFII:** MOPS 10mM; RbCl 1mM; CaCl<sub>2</sub> 100mM; Glicerol 11.9 % p/v; Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 0.5M y esterilizar por filtración.

### **7.2.8. Transformación de *E. coli* DH5α**

Para la transformación de células competentes de *E. coli*, se siguió el protocolo que se detalla a continuación y descrito por Rodríguez & Tait (1983):

1. Descongelar las células competentes en hielo
2. Añadir 5-6µl de producto de ligación y agitar suavemente.
3. Colocar las células 30min. en hielo
4. Incubar 50seg. a 42°C

5. Enfriar en hielo 2 min.
6. Añadir 900µl de LB
7. Incubar 1h a 37°C en agitación.

Se siembran 150 y 300µl de las células en placa de LB con Amp100, 40µl X-Gal y 40µl IPTG

---

**Amp** 100mg/ml

**X-Gal** 20mg/ml en dimetilformamida

**IPTG** 20mg/ml en agua miliQ estéril

### **7.2.9. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli***

Se usó el kit de extracción Qiaprep Spin Miniprep kit de Qiagen (EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **7.2.10. Secuenciación de productos de PCR**

Para la secuenciación del producto de PCR amplificado, el ADN eluído se procedió a su ligación en el vector de clonación PGEM-T Easy Vector (Promega) o el Cloning-TA (Invitrogene). A continuación se procedió a transformar células competentes de *E. coli* DH5α según el protocolo 7.2.8. Las colonias blancas (aquellas que contienen un inserto que interrumpe el gen de la β-galactosidasa) que se obtuvieron se comprobaron mediante PCR con los cebadores universales M13F y M13R usando el programa estándar de PCR o mediante la acción de enzimas de restricción. Aquellas que contenían el inserto de tamaño esperado se escogieron para la extracción del vector mediante el uso del kit comercial Qiaprep (QuiaGen) y su posterior secuenciación según las instrucciones del servicio técnico de secuenciación.

En un tubo de 200µl se ponen las siguientes cantidades:

0.4-1µg ADN de cadena doble

6.4pmol Primer

H<sub>2</sub>O c.s.p. 12µl

### **7.2.11. Análisis de las secuencias nucleotídicas**

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se contrastaron con las presentes en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). Para poder ver con la secuencia nucleotídica de que organismos presentaba mayor grado de homología y se realizó el alineamiento múltiple de las mismas. Cada una de las secuencias obtenidas se introdujo en la base de datos del EBI (Instituto Europeo de Bioinformática) proporcionándonos para cada una de las secuencias una clave de acceso.

### 7.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones de fabricante y usando las condiciones y tampones óptimos a cada enzima.

Cebadores	Secuencia	Uso
<b>Hongos MA</b>		
NS31	TTggAgggCAAgtCTggTgCC	Universal
AM1	gTTTCCCgTAAAggCgCCgAA	Específico glomales
NS31-GC	CgCCCggggCgCgCCCCgggCggggCgggggCACggggg CgCCCggggCgCgCCCCgggCggggCgggggCACggggg CgCCCggggCgCgCCCCgggCggggCgggggCACggggg -NS31	NS31 con cola de GC para TGGE
Inglo2	5'-gCCTgCTTTAAACTCTA-3'	Específico de Glomales
<b>Generales</b>		
M13F	5'-gTAAACgACggCCA-3'	Universal
M13R	5'-CAggAAACAgCTATgAC-3'	Universal
27F	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	Universal;
1495R	CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA	Lane, 1991; Weisburg <i>et al.</i> , (1991)
<b>Específicos de <i>Azospirillum</i></b>		
VKnpt01f (pFAJ5002)	GGATCCCACGCTGCCGAAGCACTCAGG	Amplificación promotor <i>PnptII</i>
VKnpt02r (pFAJ5002)	GGATCCAAGCTTATCCTGTCTCTTGATCAGATCT	Cebador 3'-5' para el promotor <i>PnptII</i> , con un sitio extra <i>BamHI</i>
Azo211f (pFAJ5005)	GCCCATGTCTTCTCGTTCACG	Cebador 5'-3' para el promotor <i>sbpA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp245
Azo238 (pFAJ5002)	CTGAGAATCCACGCTGCCGAAGCACTCAGGG C	Cebador 5'-3' para el promotor constitutivo <i>npII</i> con un sitio extra <i>EcoRI</i>
Azo239r (pFAJ5005)	ATGCGAGCTCTTACTCTCCCGACCTTACTCCCG	Cebador 3'-5' para el gen <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp245 con un sitio extra <i>SacI</i>
Dpipdc2AS	GGATCCTTACTCTCCCGACCTTACTCCCG	Cebador 3'-5' para el gen <i>ipdC</i> def <i>A. brasilense</i> Sp245 con un sitio extra <i>BamHI</i>
Bact15 22 -b-S	5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT- 3'	Ranjard <i>et al.</i> , 2000
Bac- 132-a- A-18	5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'	

**Tabla 5:** Cebadores empleados en la amplificación de hongos y bacterias

## **8. Estudio filogenético**

A partir de los datos obtenidos de la secuenciación de los productos de PCR, se realizaron los distintos análisis filogenéticos de las distintas especies utilizando el programa de alineamiento múltiple de secuencias Clone Manager 6 (versión 6.00) que incorpora aplicación Aling Plus 4 (versión 4.1). Con la ayuda del programa PHYLIP se calculó el porcentaje de sustitución nucleotídica entre las secuencias, usando la distancia 2-parámetro de kimura (Kimura, 1980).

En el análisis filogenético de las secuencias de esta región se ha utilizado el método de distancia (Saitou & Nei, 1987), con el programa PHYLIP. Con el método de las distancias se realizó un bootstrap con 1000 réplicas, seguido de un análisis de neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) (opción NEIGHBOR).

El árbol filogenético obtenido mediante el método de distancias se visualizó con la ayuda del programa Tree View (Win 32 v1.50).

## **9. Actividades enzimáticas en raíces micorrizadas**

### **9.1. Actividad Fosfatasa alcalina**

#### **9.1.1. Trigo (ELF-97®)**

Para la determinación de la fosfatasa alcalina en raíces de trigo se utilizó el sistema ELF-97®. Para ello, se tomó una alícuota de cada raíz, disponiéndolas individualmente en tubos ependorff con tampón PBS - Tween 20, pH=8 durante 10 min., para permeabilizar las muestras. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS durante 5min. y a continuación se montaron las raíces en un portaobjetos. Para comprobar tanto el tiempo de incubación como la dilución mas adecuada para la visualización de la reacción ELF en las raíces de trigo, se procedió previamente a usar diluciones 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40 durante 10, 30, 60 y 120 min.

Una vez montadas se añadió 20µl/lámina del sustrato fluorescente durante 2 horas, en una relación 1:30 de componente A (sustrato fluorescente) y componente B (buffer de detección), el cual se reconstituyo al momento de usarse. A continuación se añadió el buffer de parada que contiene el inhibidor de la actividad fosfatasa alcalina. Finalmente se lavaron cuidadosamente las raíces, para así eliminar el precipitado fluorescente del sustrato. La observación de los fragmentos de raíces se realizó al microscopio de fluorescencia usando los objetivos necesarios para la óptima observación de la fluorescencia en cada momento.

#### **9.1.2. Maíz**

Este método de tinción se aplicó a las raíces de maíz colonizadas por hongos MA ya que no se logró la visualización de la actividad mediante el sustrato fluorescente ELF-97®.

La tinción se realizó según el protocolo descrito por Tisserant *et al.*, (1993). Los fragmentos de raíces se incubaron en una solución fresca que contenía 50mM de ácido cítrico-Tris, pH 9.2, 1mg/ml de ácido alfa-naftil fosfato, 0.05% MgCl<sub>2</sub> anhidro, 0,05% MnCl<sub>2</sub> ·4H<sub>2</sub>O y 1mg/ml de Fast Blue RR Salt. Las raíces se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y posteriormente se clarificaron durante 15-20 min. en una solución de lejía comercial al 1%. Los fragmentos de raíz se dispusieron en portas de la misma manera que las raíces teñidas con azul tripan y se cuantificó el % de raíz que presentaba actividad.

## **9.2. Determinación de AIA**

Como se ha descrito en la introducción, la síntesis de Acido 3-Indolacético por las cepas bacterianas inoculadas, es, desde el punto de vista fisiológico de la planta el proceso más importante para la promoción del crecimiento. Se ha determinado la producción de AIA tanto en los cultivos bacterianos (suplementados o no con Try y en su caso, Arabinosa) como en el suelo recuperado de los ensayos de trigo y maíz. Para la determinación de esta auxina se siguió el procedimiento descrito por Wöhler (1997).

### **Determinación de AIA en sobrenadantes**

Los cultivos se crecieron en LB en presencia de los antibióticos correspondientes. A cada tratamiento se le añadió o no Try a una concentración de 100µg/ml con o sin arabinosa 10mM.

Se procedió a inocular los matraces Erlenmeyer y medir la D.O.<sub>600</sub> desde un T=0 hasta T=80 y la producción de IAA según el método Salper.

Para la determinación del AIA se tomaron 4ml de medio, los cuales se centrifugaron a 4000rpm a 4° C. A 3ml de sobrenadante y se le añadieron 2ml de reactivo de Salper y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se determinó en el espectrofotómetro a 535nm.

## **10. Actividades Enzimáticas en suelo**

### **10.1. Determinación de AIA en suelo (Wöhler, 1997)**

Se tomó una alícuota de 1g de suelo problema para la determinación y en paralelo se trató otro como blanco. Se añadieron 3ml de tampón fosfato y 2ml de triptófano 1% (excepto a los blancos). Se incubó en baño con agitación a 37°C durante 20h. Pasado ese tiempo, se le añadieron 2ml de triptófano a los blancos. A todas las muestras se le añadieron 1ml de Ac. Tricloroacético al 5% y 0.5ml de CaCl<sub>2</sub> 0.5M. Se centrifugó durante 10min a 4000 rpm. Se tomaron 3ml de sobrenadante y se añadieron 2ml de solución Salper. Se agitó en vortex y se

incubó durante 30min en oscuridad. La mezcla se determinó en el espectrofotómetro a 535nm. A los valores obtenidos se les restó la lectura del blanco correspondiente.

Curva patrón:

ppm AIA	Solución madre IAA	Reactivo de Salper	H2O
0 ppm	-	2ml	3ml
2.5 ppm	0.375ml	2ml	2.625ml
5 ppm	0.75ml	2ml	2.25ml
10 ppm	1.5ml	2ml	1.5ml
20 ppm	3ml	2ml	-

Reactivo de Salper:

98ml Ac. Perclórico 35%; 2ml FeCl3 0.0%M

## 10.2. Actividad deshidrogenasa

Para la determinación de la actividad SDH se pesa 1 g de suelo en tubos de vidrio con rosca específicos para esta actividad. Se ha de pesar un blanco para cada muestra.

A todas las muestra se le añaden 0,2 ml de agua destilada, 0,2 ml de Iodo Nitro Tetrazolio (INT) al 0,4% menos a, los blancos que se les añaden 0,2 ml de agua destilada.

A continuación las muestras se incuban durante 20 horas a 20° C en oscuridad. Tras la incubación se añade a todas las muestras 5 ml de la mezcla extractora (tetracloroetileno:acetona; 1:1,5). Tapar y agitar en vortex durante 1 min.

Centrifugar a 4000rpm durante 10 minutos.

Se toman 2,5ml del sobrenadante con cuidado de no tomar la fase acuosa.

El sobrenadante extraído se diluye 1:2 en la mezcla de extracción y se mide en cubeta de cuarzo a 490nm.

Los resultados se expresan en  $\mu\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Preparación de la curva

Preparar una curva con una solución patrón de INTF de 100 ppm y se preparan sucesivamente diluciones de 60, 40, 20, 10, 5 y 0 ppm

### **10.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa**

Se toman 0.5 g de suelo en tubos de plástico con tapón y se pesa un blanco para cada una de las muestras.

Como sustrato de la reacción se utiliza 4-Nitrophenil- $\beta$ -D-glucopiranoside (PNG) 50 mM.

A cada muestra se le añaden 0.5ml de PNG y 2ml de tampón maleato pH 6,5. A los blancos se les añade sólo el tampón maleato.

Tanto las muestras como los blancos se incuban en baño de agua durante 2 horas a 37 °C. Una vez finalizada la incubación a los blancos se les añaden 0.5 ml de PNG.

Posteriormente se añaden 0.5 ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0.5 M y 2 ml de NaOH.

Agitar en vortex y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se mide en espectrofotómetro a 398nm.

Los resultados se expresan en ug de PNP/g h.

#### **Tampón maleato (0.1 M pH 6.5)\***

---

Solución A: 0.1 M de solución de ácido maleato sódico (4 g de NaOH + 11.6 g de Ac. Maléico en 1000 ml de H<sub>2</sub>O).

Solución B: 0.1 M NaOH (4 g de NaOH en 1000 ml de H<sub>2</sub>O).

(\*) 50 ml de A + 39 ml de B + 111 ml de H<sub>2</sub>O

### **10.4. Actividad fosfatasa**

Se pesan 0.5 g de suelo en tubos de plástico con tapón y se pesa un blanco para cada muestra.

Como sustrato de la reacción se usa P-nitro fenil fosfato (PNPP) 0,115 mM.

A cada muestra se le añade 0,5 ml de PNPP + 2 ml de tampón maleato pH 6,5.

A los blancos se les añade sólo el tampón maleato.

Tanto las muestras como los blancos se incuban en baño de agua durante 2 horas a 37 °C. Una vez finalizada la incubación a los blancos se les añaden 0.5 ml de PNPP .

Posteriormente se añaden 0.5 ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0.5 M y 2 ml de NaOH.

Agitar en vortex y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se mide en espectrofotómetro a 398nm.

Los resultados se expresan en ug de PNP/g h.

Curva de PNP.

Se prepara una solución de 1000 ppm de 4-nitrophenol (PNP).

Se hacen las siguientes diluciones para la curva 5, 10, 20, 30, 50, 100 y 200.

ppm PNP	ml H <sub>2</sub> O	ml sol. 1000 ppm
0	5	0
5	4.75	0.25
10	4.5	0.5
20	4	1
40	3	2
80	1	4

## ***11. Análisis estadístico de los resultados***

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y un test de media de Duncan a un nivel de significación del 95%. Las letras diferentes presentadas junto a los valores indican diferencia significativa entre los tratamientos.

Los valores porcentuales se transformaron en su arcoseno para su tratamiento estadístico.

Las barras de error presentadas en las figuras corresponden al Error Estandar.



### ***III. Resultados***



### III. RESULTADOS

#### ***1. Propiedades básicas de los inóculos de Azospirillum***

En este Capítulo se presentan los experimentos diseñados para investigar las propiedades básicas de los inóculos de *Azospirillum* y algunos de los efectos primarios que estas bacterias ejercen sobre la planta. Dentro de la temática común de estos ensayos, es obvio que exista cierta diversidad. Es por ello que se presentan sistematizados como sigue:

- 1.1. Capacidad para establecimiento y recuperación de *Azospirillum* inoculados en raíces de maíz y trigo
- 1.2. Capacidad para producir AIA *in vitro*. Uso de un inductor del gen *ipdC* y un precursor de AIA
- 1.3. Efectos sobre la longitud radical y colonización micorrízica

En cada caso se exponen sub-capítulos de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión específicos.

#### ***1.1. Capacidad para establecimiento y recuperación de Azospirillum inoculado en raíces de maíz y trigo***

##### ***1.1.1. Introducción***

Es obvio que la persistencia de un microorganismo en la rizosfera es crucial para que éste ejerza las funciones para la que ha sido introducido. El microorganismo inoculado para un propósito determinado debe continuar en la rizosfera en número de células y tiempo suficientes que permitan ejercer su efecto. Por lo general, al introducir un microorganismo en la rizosfera, la población tiende a disminuir debido a las condiciones en las que se encuentra así como a la competición con otros microorganismos rizosféricos que ya se encuentran establecidos. Las características del microorganismo son críticas para la supervivencia en la rizosfera. *Azospirillum* es un género adaptado a numerosos medios edáficos y asociado a multitud de cultivos. La versatilidad del género se debe a la capacidad que tiene de usar diferentes compuestos carbonados y a la capacidad de formar quistes para resistir las condiciones adversas.

Si un microorganismo ha sido modificado para incrementar una característica beneficiosa, el resto de características de la cepa original, deben quedar intactas (o en su caso mejoradas) en la cepa modificada. Las características de la cepa silvestre en cuanto a establecimiento y persistencia en la rizosfera deben mantenerse en la cepa GM para mantener las características de promoción del crecimiento vegetal y competitividad con otros microorganismos (Tang *et al.*, 1995).

En diversos ensayos de campo se ha comprobado que el número de células de PGPR aplicadas como inóculo es vital para producir el efecto de promoción del crecimiento de la planta (Boddey & Dobbereiner, 1988), aunque las cifras recomendadas varían considerablemente en la bibliografía disponible. Así, *Azospirillum* sp. Ha sido inoculado en concentraciones que varían desde 10<sup>8</sup> ufc por semilla (Weller & Cook, 1986; Okon *et al.*, 1988; De Freitas & Germida, 1991; Di Ciocco & Rodriguez-Caceres, 1994; Fages, 1994; Tran Van *et al.*, 2000) a incluso 10<sup>9</sup> ufc por semilla (Paredes-Cardona, 1988; De Freitas & Germida, 1990; Fallik & Okon, 1996; Lalonde *et al.*, 2002;). El número de células a inocular se torna crítico al tener en cuenta que un exceso puede ser perjudicial para la germinación de la semilla o crecimiento de la planta (Chanway, 1997). Se ha visto que el efecto promotor del crecimiento se ejerce incluso con bajas concentraciones bacterianas y que el establecimiento inicial en la semilla por adhesión a ella, juega un papel incluso mas importante que la persistencia en el suelo del inóculo (Jacoud *et al.*, 1998).

El objetivo de este experimento es averiguar la persistencia en la rizosfera de las cepas de *Azospirillum* sp. utilizadas como inóculo. Esta información es fundamental cuando se trata de un microorganismo genéticamente modificado (GM). Concretamente, se trató de averiguar la persistencia de los inóculos GM y WT para, junto con los datos obtenidos en el experimento efectividad de inoculante, proceder a la selección de la bacteria GM con la que seguir trabajando.

### **1.1.2. Material y métodos**

Para el seguimiento de los inóculos se han utilizado tanto técnicas clásicas de recuperación de bacterias, por dilución y siembra en placa, como técnicas moleculares, basadas en la amplificación por PCR.

Se diseñó un ensayo proceder a la recuperación de los inóculos de *A. brasilense* Sp245 WT, GM 5002 y GM 5005 y se utilizaron plantas de trigo y maíz. Se emplearon macetas de 1 L de capacidad que contenían 1 kg de suelo (1, Material y Métodos general). Se sembró una semilla por maceta y se inoculó con una suspensión de 5x10<sup>5</sup> de cada una de las cepas. Se prepararon 63 macetas para cada una de las plantas que permitieron realizar 7 cortes, utilizando tres repeticiones para cada uno de los tiempos de corte.

#### Recuperación de los inoculantes

Una vez obtenidas las raíces se eliminó el exceso de suelo adherido, se tomo una muestra de raíz de peso conocido de cada planta Las aliquotas de raíz se sumergieron en 50ml de solución Ringers estéril, se dejaron en agitación durante 30min y se mantuvieron en un baño de sonicación durante 1 min. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y sembraron en placas que contenían un medio

selectivo. La recuperación de inóculos se realizó mediante la siembra en medio semiselectivo NfB libre de nitrógeno (Day & Döbereiner, 1976) suplementado con cicloheximida 100µg/ml con los antibióticos apropiados en caso necesario y Rojo Congo.

Las placas sembradas se incubaron a 28°C durante 5 días. Una vez transcurrido este tiempo, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) del microorganismo en cuestión y los resultados obtenidos se refirieron a gramo de peso seco de raíz.

### Identificación de las cepas

Las colonias de *Azospirillum* crecidas con Rojo Congo se distinguen por presentar color rojo escarlata, pero debido a que la cepa WT Sp245 no se puede seleccionar con la presión de un antibiótico, se procedió a analizar las colonias obtenidas en este tratamiento mediante ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Russo *et al.*, 2005). Las colonias se resuspendieron en 75µl de H<sub>2</sub>O mQ estéril mediante vortex y se calentaron a 100 °C durante 10 min. La amplificación de subunidad 16S rDNA se realizó usando los primers 27F y 1495R. Para la PCR se emplearon 5µl de lisis de la colonia y se utilizó un programa estándar. Para la restricción de los productos de PCR se emplearon las enzimas *AluI* y *RsaI*. La mezcla de reacción se realizó con 5µl de producto de PCR en un volumen final de 20µl. El volumen total de la restricción se corrió en gel de agarosa al 2% en TBE.

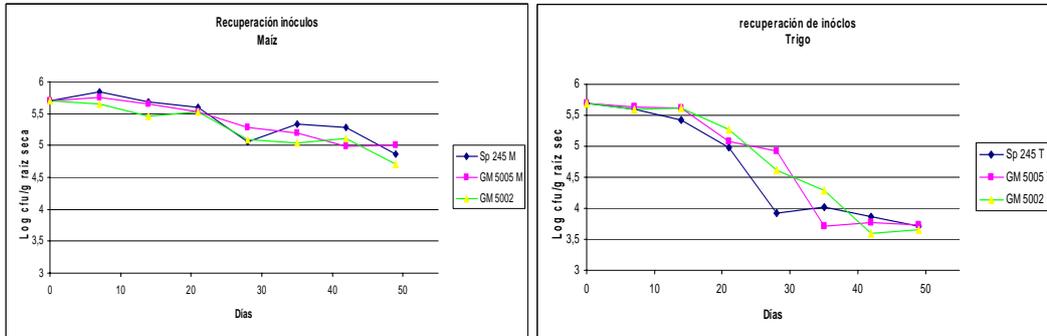
Dado que las dos cepas GM presentan un patrón de restricción igual al de la cepa silvestre y para cerciorarse de que dichas cepas recuperadas no habían perdido el plásmido dónde se encuentra incluido el promotor correspondiente con el gen *ipdC*, se emplearon cebadores específicos para cada una de las cepas. Para la identificación de las cepas genéticamente modificadas se dispone de parejas de cebadores específicos que amplifican específicamente los promotores que lleva cada una de las cepas GM (Tabla 5, Material y Métodos general).

### **1.1.3. Resultados**

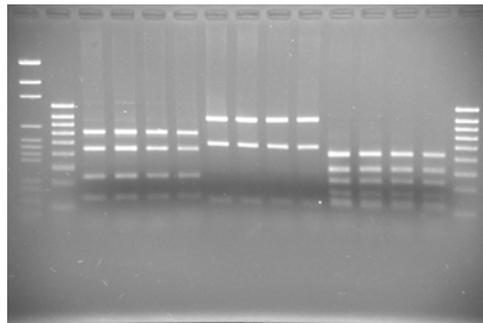
La recuperación de los inóculos tanto en plantas de maíz como de trigo, reveló que las poblaciones microbianas sufren un brusco descenso con el tiempo. Sin embargo estas se mantienen en unos niveles basales en la raíz de dichas plantas (Fig. 1.1). La amplificación y restricción de la subunidad 16S del ADNr permitió la identificación de las cepas recuperadas (Fig. 1.2). Partiendo de la inoculación de  $5 \times 10^5$  ufc sobre la semilla pregerminada, la población de bacterias inoculadas va disminuyendo hasta la 5ª semana de la inoculación, cuando se estabiliza este descenso y se mantiene en valores que rondan  $10^4$  ufc/g de raíz. La evolución de las tres cepas fue similar entre ellas, observándose solamente un brusco descenso

en la cuarta semana de cultivo en las plantas de trigo aunque en los posteriores muestreos se igualaron.

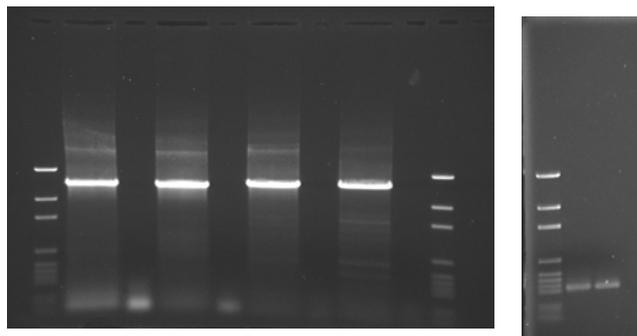
La estabilidad de los plásmidos portadores del gen *ipdC* se pudo controlar gracias a los cebadores diseñados específicamente para cada una de las cepas (Fig. 1.3). A lo largo del tiempo, las cepas GM mantuvieron los plásmidos, algo esperado por derivar estos del pLAFR3, usado comúnmente en *Azospirillum* (Vande Broek *et al.*, 1999).



**Figura 1.1:** Recuperación de los inóculos de *Azospirillum* en raíces de trigo y maíz.



**Figura 1.2:** Restricción enzimática de productos de PCR (27f y 1495r) amplificados de colonias recuperadas del suelo. Calle 3, 7 y 11 corresponden a la cepa original. Calles 3-6 restricción por *AluI*, calles 7-10 a *RsaI* y 11-14 restricción por ambas enzimas. Marcadores: PGEM y Scala2.



**Figura 1.3:** Gel de agarosa al 1.2% de productos de PCR. (A) Amplificación de 2kb con los primers Azo238/Azo239 (calle 1) y 2kb Vknpt01/Dpipdc2As (lane 2) correspondientes al fragemento PnptII-ipdC in pFAJ5002. Amplificación de 2.2kb con los primers Azo211/Dpipdc2As (linea 3) y Azo211/Azo239 (linea 4) de parte del promotor sbpA y del gen completo *ipdc* en pFAJ5005. (B) amplificación de 300pb del promotor PnptII con las parejas de primers Vknpt01/Vknpt02 (calle 1) y Azo238/Vknpt02 (calle 2). A la derecha de cada calle se encuentran los respectivos controles negativos. Marcador PGEM DNA.

#### 1.1.4. *Discusión*

Las bacterias inoculadas no siempre encuentran un nicho vacío donde establecerse y sobrevivir, esto solamente ocurre en casos donde se inocula sobre suelo estéril, una condición que no se da en la naturaleza). Los inóculos deben competir con la microflora autóctona que está mejor adaptada a las condiciones de crecimiento edáficas y climatológicas particulares. La inoculación de una alta concentración de bacterias puede llegar a producir un efecto adverso, inhibiéndose el crecimiento de la planta o incluso la no germinación de la semilla. La aplicación de una concentración inicial de  $5 \times 10^5$  UCF/ml a cada semilla no mostró un efecto negativo sobre la germinación de las semillas de trigo y de maíz e incluso se probó la aplicación de una concentración de  $10^6$  UCF, con el mismo resultado, concentración que fue aplicada en los restantes experimentos.

La evolución del inóculo observada se corresponde con la expuesta por Russo *et al.*, (2005) donde tras la inoculación de  $10^6$  UFC de estas cepas sobre plantas de trigo, se realizó la recuperación de los inoculantes obteniéndose resultados similares a los aquí presentados, aunque una última recuperación en la 12<sup>a</sup> semana se obtuvieron valores de  $10^2$  UCF/g seco de raíz. Probablemente en el caso aquí planteado, la cantidad de inóculo recuperado evolucionaría de forma similar, es decir, una disminución durante las primeras semanas tal y como se ha observado y un posterior mantenimiento de la población a niveles basales que incluso podrían encontrarse por debajo de  $10^2$  UFC/g seco de raíz. La disminución de las poblaciones de PGPR inoculadas ha sido descrita por Jacoud *et al.*, (1998) observando que aunque el descenso de células sea importante, la cantidad residual es suficiente para ejercer su efecto durante la temporada de cultivo. La capacidad

de persistir en el suelo durante el invierno es importante cuando se emplean las PGPR en climas fríos. Se ha visto que algunas especies de *Pseudomonas* son capaces de resistir el invierno en un número suficiente como para ejercer efecto en trigo de invierno (De Freitas y Germida, 1990), aunque en el caso de *Azospirillum* se ha observado una baja supervivencia en suelos fríos.

## **1.2. Capacidad para producir AIA in vitro. Uso de un inductor del gen *ipdC* y un precursor de AIA**

### **1.2.1. Introducción**

El efecto estimulador en la planta ejercido por *Azospirillum* se ha atribuido a varios mecanismos que incluyen la fijación biológica de N y la producción de hormonas, fundamentalmente auxinas. Las cantidades de N que es capaz de fijar no se consideran cuantitativamente importantes, por lo que la fijación de N no se considera que influya prácticamente en esta respuesta (Lethbridge *et al.*, 1982; Giller & Day, 1985; Boddey *et al.*, 1986; Okon & Kapulnik, 1986; Bremner *et al.*, 1995; Glick, 1995; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000) por ello las investigaciones se han centrado en los efectos basados en la producción de fitohormonas. En sobrenadantes de cultivos de *Azospirillum* se han detectado tres tipos de sustancias promotoras del crecimiento, auxinas, citoquinas y giberelinas, (Tien *et al.*, 1979; Reynders & Vlassak, 1979; Bottini *et al.*, 1989) aunque cuantitativamente las más importantes son las auxinas y concretamente el AIA (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Se observó que la inoculación de *Azospirillum* produce una alteración en la morfología radical de la planta, respuesta que se atribuyó a la producción del AIA (Okon & Vanderleyden, 1997; Ona *et al.*, 2005). La producción de esta fitohormona va a dar lugar a un mayor desarrollo del sistema radical, pudiendo afectar tanto a la morfología como a la arquitectura del mismo, y a la fisiología de la planta. Esto puede tener consecuencias tanto sobre el desarrollo de la planta como sobre la formación y función de la MA, lo cual indirectamente va a implicar un beneficio para la planta (Linderman, 1992; Barea *et al.*, 2005).

Las fitohormonas secretadas por *Azospirillum* podrían estimular la susceptibilidad de la planta a la micorrización, la germinación de las esporas o el desarrollo del micelio, lo cual aumenta, en definitiva, la posibilidad de contacto entre la planta y el hongo, incrementando así los niveles de colonización radical por parte del hongo MA (Balota *et al.*, 1995).

Se han descrito diferentes mutantes de *Azospirillum* afectados en la producción de AIA, sin embargo, todos producen cantidades residuales de esta auxina, lo que demuestra que en *Azospirillum* existen al menos dos vías generales para la síntesis de la misma, una dependiente de triptófano y otra independiente de este aminoácido (Hartmann *et al.*, 1983; Abdel-Salam & Klingmüller, 1987)..

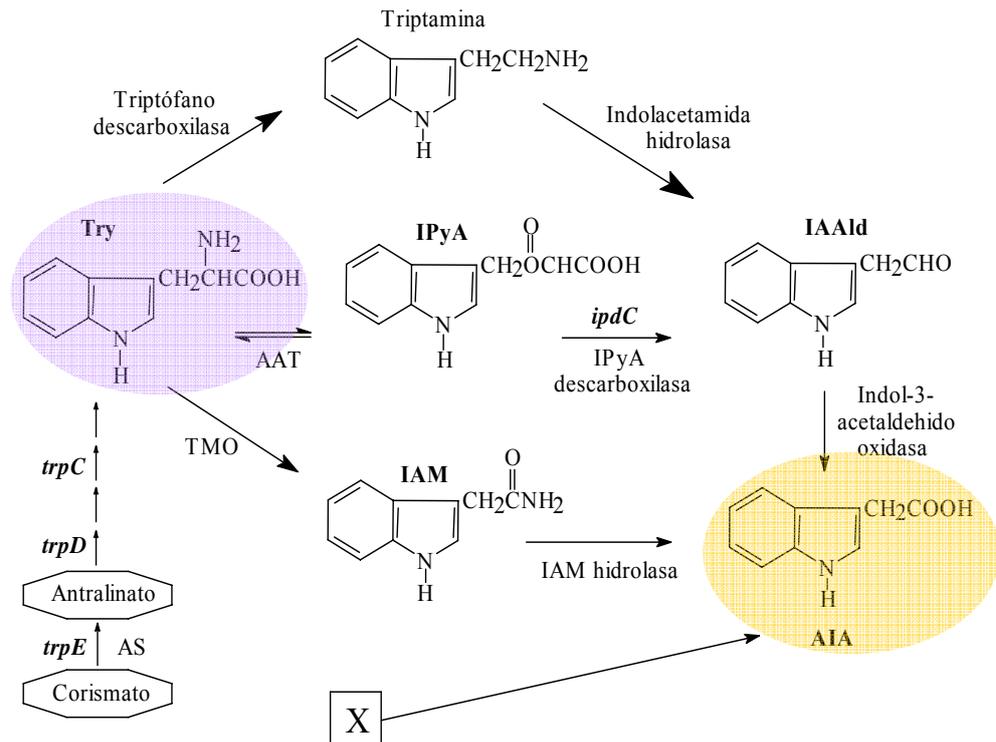
El triptófano (Try) se ha considerado precursor del AIA, ya que se ha observado que su adición a cultivos de *Azospirillum* incrementa los niveles de producción de auxina (Costacurta & Vanderleyden, 1995). Se han descrito diversas vías de síntesis de IAA a partir de Try en bacterias (Figura 1.4). De

estas, hay tres vías principales para la síntesis de AIA: la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), la vía indol-3-acetamida (IAM) y la vía de la triptamina (TAM) (Costacurta & Vanderleyden, 1995; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Los genes mencionados en la Figura 1.4 han sido aislados y caracterizados en *A. brasilense* (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Cada una de estas vías es usada mayoritariamente por diferentes especies bacterianas, así, *Enterobacter cloacae* usa preferentemente la vía IPyA, *Pseudomonas syringae* la vía IAM mientras que *P. fluorescens* usa directamente el Try evitando el paso de la IPyA y convirtiéndolo directamente en Indol-3-acetaldehído, el cual pasa posteriormente a AIA. En *Azospirillum* se han descrito todas estas vías, habiéndose sugerido que el 90% de la producción de AIA procede de la vía independiente de Try cultivado en medio mínimo, mientras que en presencia de Try la vía dependiente se convierte en la más efectiva. Se ha asumido que la síntesis bacteriana de AIA es el resultado de la vía de detoxificación del Try (Bar & Okon, 1992; Lebuhn *et al.*, 1997; Zakharova *et al.*, 1999) no existiendo otra vía alternativa en *A. brasilense* para su degradación (Lebuhn, & Hartmann, 1994).

Mediante el uso de un mutante en el gen *ipdC* se observó que la síntesis de AIA disminuía a menos de un 10% de lo que producía la cepa silvestre, lo que indica que la IPyA descarboxilasa es una enzima clave en la biosíntesis del IAA en esta bacteria (Prinsen, *et al.*, 1993). Este hecho ha situado al gen *ipdC* como objetivo de las actuales modificaciones genéticas en el campo de la síntesis de IAA por el género *Azospirillum*.

Se ha visto que este gen se encuentra regulado por AIA y por otras auxinas como el ácido 1-naftalenacético y clorofenoxiácidos (Vande Broek *et al.*, 1999). Los resultados de campo obtenidos tras la inoculación de *Azospirillum* han sido a veces inconsistentes (Bashan, 1998), lo que sugiere que la biosíntesis bacteriana de AIA puede verse drásticamente afectada por factores medioambientales. Se han descrito un número considerable de factores, aunque no se ha definido claramente su papel en la biosíntesis de AIA. Así, Ona *et al.*, (2005) hacen referencia a algunos de los factores que influyen en la expresión de *ipdC* como la concentración de O<sub>2</sub> y la disponibilidad de C.



**Figura 1.4.** Ruta de biosíntesis para la producción de triptófano y ácido indol-3-acético en *A. brasilense*. IAM, indol-3-acetamida; IpyA, ácido indol-3-piruvico; IAAld, indol-3-acetaldehído; AIA, ácido indol-3-acético; X, precursor desconocido; As, antranilato sintasa; TMO, triptófano-2-monooxigenasa; AAT, ácido amino aromático aminotransferasa.

La adición de sobrenadantes de cultivos de *Azospirillum* libres de células a cultivos hidropónicos de arroz incrementa la longitud radical, la superficie radical, el peso seco de las raíces y el desarrollo tanto de raíces secundarias como de pelos radicales con respecto a controles no inoculados, típicos efectos de las auxinas presentes en tales sobrenadantes. Mayores concentraciones de estos sobrenadantes inhiben fuertemente los efectos anteriormente descritos a la vez que causan la aparición de tumores en las raíces (El-Khawas & Adachi 1999; Bashan *et al.*, 2004). Resultados similares se han obtenido al aplicar estos sobrenadantes en soja (Molla *et al.*, 2001b). La inoculación de trigo con *A. brasilense* Sp245 y Sp5 muestra un descenso en la longitud radical mientras que aumenta la formación de pelos radicales. El efecto sobre la morfología radical se ve reforzado al añadir Try y estos efectos se han reproducido al sustituir el cultivo bacteriano por concentraciones adecuadas de AIA (Dobbelaere *et al.*, 1999 en Bashan *et al.*, 2004).

Las modificaciones genéticas que se están estudiando en el presente trabajo doctoral, afectan a la síntesis de AIA. La presencia de exudados radicales y de sus componentes, produce en la bacteria seleccionada (PFAJ5005) la activación del promotor *SbpA* (Van Bastelaere *et al.*, 1999) que induce la expresión del gen *ipdC*.

La vía de síntesis mayoritaria de AIA en *Azospirillum* es la vía del IPyA descarboxilasa, enzima codificada por el gen *ipdC* y que utiliza el triptófano como sustrato. Por ello, para la determinación de la producción de AIA en cultivo se han empleado tanto triptófano como arabinosa, un componente de los exudados radicales que se ha demostrado que es reconocido por el promotor *SbpA* (Van Bastelaere *et al.*, 1999).

### **1.2.2. Material y métodos**

#### **Diseño experimental**

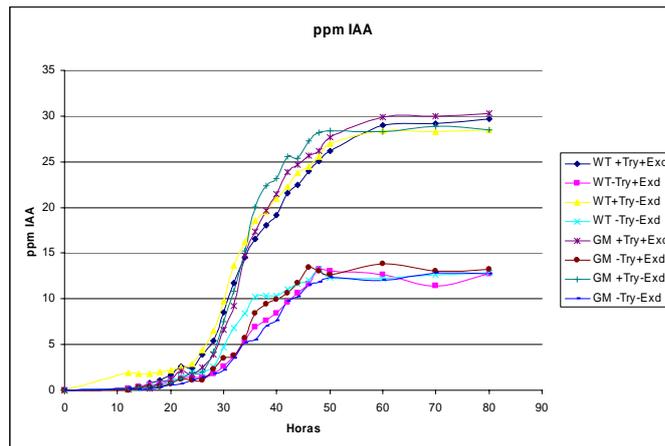
Las cepas de *Azospirillum* se hicieron crecer en presencia o no de Try a una concentración de 100µg/ml con o sin exudados radicales de maíz en una concentración del 10%. El cultivo se efectuó en matraces Erlenmeyer tomándose muestras cada 2h para determinar la D.O. desde un T=0 hasta T=40 y la producción de AIA según el método Salper.

Ante la posibilidad de que los exudados radicales no ejercieran efecto sobre la producción de AIA, debido a que los compuesto responsables no se encuentren en las concentraciones adecuadas para el aumento de la de la expresión del gen *ipdC*, se desarrolló el experimento sustituyendo los exudados radicales por arabinosa a una concentración 10mM (Van Bastelaere, 1999). Se utilizó el medio LB\* suplementado o no con Try y/o arabinosa.

### **1.2.3. Resultados**

Todas las curvas de crecimiento, tanto la WT como la GM presentan un máximo de crecimiento aproximadamente a una D.O. 1.8, correspondiéndose ésta a 10<sup>9</sup> UFC (Figura 1.6).

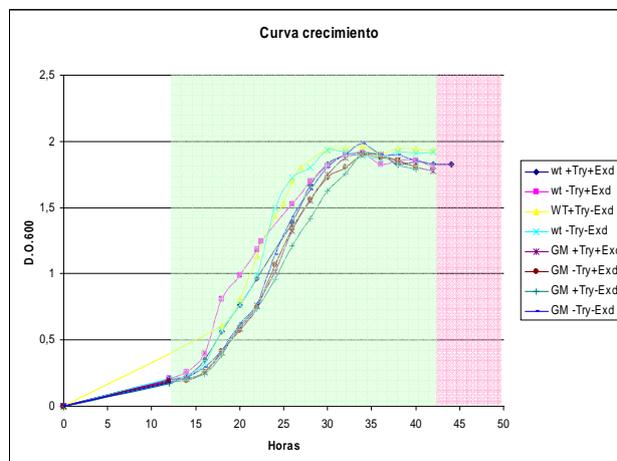
Los exudados radicales no ejercieron un efecto determinante en la producción de AIA, sin embargo se observa que en presencia de Try se produce un claro incremento en la síntesis de la auxina (Figura 1.5).



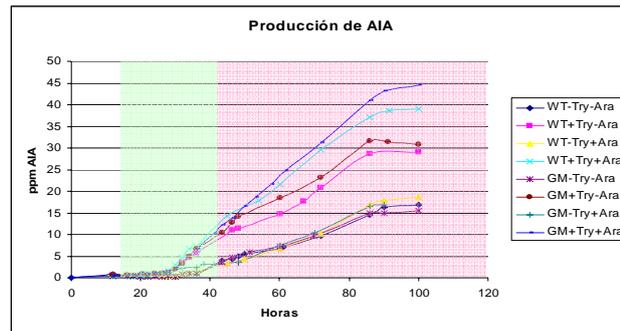
**Figura 1.5:** Síntesis de AIA en cultivos de *Azospirillum* suplementados o no con try y/o exudados radicales.

También la presencia de arabinosa en el medio afectó la síntesis de AIA en los cultivos bacterianos. En cualquier caso, se demuestra que la ausencia de Try en el medio es el factor limitante en la producción de AIA. Cuando no se adiciona Try al medio, ninguna de las bacterias respondió significativamente en cuanto a producción de AIA.

En presencia de Try, sin adición de arabinosa, el comportamiento de GM se asemeja al de la WT. Cuando se adiciona arabinosa, siempre en presencia de Try, se induce la expresión del gen *ipdC* y por tanto la síntesis de AIA. En todos los casos, GM produce mayor cantidad de AIA que su control WT correspondiente (Figura 1.7).



**Figura 1.6:** Curva de crecimiento en cultivos adicionados o no con Try y/o arabinosa.



**Figura 1.7:** Curva de crecimiento y producción de AIA en cultivos adicionados o no con Try y/o arabinosa.

#### 1.2.4. Discussion

La adición de exudados radicales de maíz a cultivos de *Azospirillum* no mostró cambios en la síntesis de AIA entre las cepas WT y GM. Ambas cepas tuvieron un comportamiento similar. Esto puede ser explicado por la composición de los exudados radicales. Estudios de expresión génica llevados a cabo por Van Bastelaere *et al.*, (1999), sobre *sbpA*, revelan un incremento cuando la concentración de azúcares (D-galactosa, D-fucosa o L-arabinosa) se adiciona al medio. Este incremento de la expresión tiene lugar cuando los cultivos se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento. La concentración de estos azúcares es decisiva, conforme aumenta la concentración los niveles de expresión son mayores. Por otro lado, la disponibilidad de C también afecta, así, la expresión se incrementa cuanto menor es la cantidad de C disponible. Se ha observado que la adición de exudados radicales tiene un efecto similar al producido por la adición de D-galactosa 10 $\mu$ M (mínima concentración empleada).

En este estudio, la producción de cantidades similares de AIA en ambas cepas en presencia o no de exudados radicales (Figura 1.5), hace pensar que la concentración de azúcares presentes en el medio de cultivo, además del hecho de haber empleado un medio de crecimiento rico, no es suficiente para incrementar la expresión del gen *ipdC* y en consecuencia la síntesis de AIA.

Para determinar este efecto, se repitió el experimento adicionando L-arabinosa 10mM, concentración que incrementa la expresión (Van Bastelaere *et al.*, 1999). Al igual que en el caso anterior, la síntesis de AIA en ausencia de Try no se ve afectada por la adición o no de arabinosa. Al incluir arabinosa a los cultivos suplementados con Try, la producción de AIA se incrementó en ambas cepas. El máximo valor fue producido por la cepa GM. Esto concuerda con los resultados anteriormente descritos. Aunque el estudio realizado por Bastelaere y colaboradores se refería a la proteína SbpA, es de suponer, que ya que el promotor que controla la síntesis de esta proteína se ha introducido en la bacteria GM 5005 delante del gen *ipdC*, habrá un incremento en la expresión del gen, y por

consiguiente, como se observa, un aumento (aunque no muy elevado), en la síntesis de AIA.

### **1.3. Efectos sobre la longitud radical y colonización**

#### **1.3.1. Introducción**

En el apartado 1.2 de este capítulo se hace referencia al efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre la estructura radical. Este efecto, debido a la producción de AIA, hace incrementar el número de raíces laterales y la densidad de pelos radicales que a su vez favorecen la absorción de nutrientes (Okon & Kapulnik, 1986). A su vez, este cambio en la morfología puede afectar a los microorganismos asociados a la rizosfera, entre los que se encuentran los hongos MA. Igualmente, la formación de MA puede afectarse debido a los cambios en diversos aspectos de su fisiología y ciclo vital debido a los cambios tanto cualitativos como cuantitativos de los exudados radicales. Por otra parte, el incremento de la superficie radical por el desarrollo de las raíces secundarias es otro de los factores que pueden influir en las MA

#### **1.3.2. Material y Métodos**

##### **Diseño experimental**

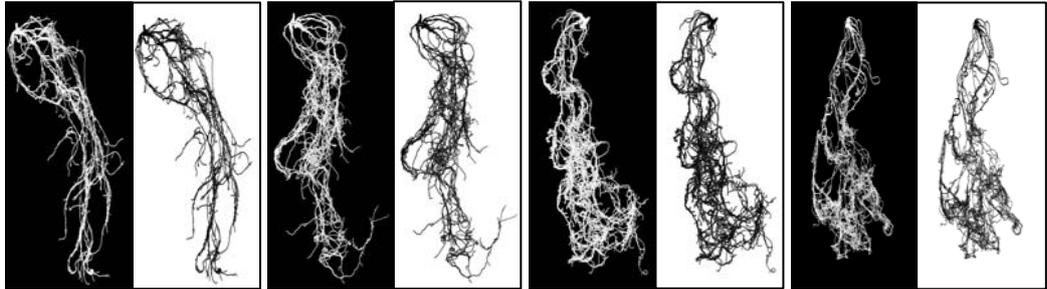
Para este ensayo se emplearon macetas de 1 L que contenían 1 kg con suelo natural. Se plantó una semilla por maceta y cada tratamiento consistió en 4 repeticiones por cosecha y planta. Los tratamientos microbianos consistieron en la inoculación de las cepas WT, GM 5005, CRT1 y un control sin inocular (punto 4 de Material y Métodos general). Dando lugar a 60 macetas para cada especie vegetal.

Las semillas se inocularon como se describe en el punto 4 de Material y Métodos general. La primera determinación se realizó a los 7 días después de la siembra cuando las plantas se encontraban desarrollando la segunda hoja y donde se contó el número de puntos de entrada de los hongos MA por sistema radical completo (6.5, Material y Métodos general). La longitud radical de las plantas de 2 semanas se determinó por medio de un curvómetro sobre una fotocopia de la raíz.

##### Determinación de la longitud radical en plantas de 5 semanas:

Para determinar la longitud radical de las plantas se procedió a extraer la raíz y extenderla sobre un fondo negro. A continuación se fotografió y la imagen digital

se editó en Adobe Photoshop (Figura 1.8). Varios fragmentos de raíces secundarias de longitud conocida se fotografiaron y se determinó el número de píxeles por cm de raíz que ocupaban. De la misma manera se seleccionaron los sistemas radicales completos y se determinó la longitud del sistema radical en función del número de píxeles que ocupaban. La variación en la longitud radical viene determinada por las raíces secundarias ya que la diferencia en la longitud de las raíces primarias en los diferentes tratamientos se observó que no era significativa. Para llegar a esta conclusión los sistemas radicales se extendieron y fotocopiaron. Con ayuda de un curvímeter se midió la longitud de las raíces primarias observándose que no existía diferencia significativa entre los tratamientos



**Figura 1.8:** Fotografía y digitalización de los sistemas radicales para la determinación del número de píxeles y su extrapolación a longitud radical. (A) control; (B) WT; (C) GM; (D) CRT1.

### 1.3.3. Resultados

Todos los tratamientos presentaron colonización por hongos MA, presentando valores similares respecto al número de puntos de entrada por sistema radical completo tanto en plantas de maíz como en plantas de trigo. En la siguiente cosecha, a las 2 semanas, se observó un incremento en la colonización de las plantas de maíz en los tratamientos inoculados con *Azospirillum* independientemente de la cepa empleada. Esta diferencia entre tratamientos se observó en el último corte a las 5 semanas (Tabla 1.1). En las plantas de trigo las diferencias no se observaron hasta el último corte, donde los tratamientos con *Azospirillum* presentaron un incremento en la colonización aunque fue la cepa WT Sp245 la que incrementó significativamente la intensidad de colonización.

<b>Maíz</b>	<b>Ptos. entrada raíz<sup>-1</sup> % Micorrización</b>		
	<b>7 días</b>	<b>2 semanas</b>	<b>5 semanas</b>
NI	17,39 a	48,52 b	75,65b
WT	18,45 a	70,43 a	85,72 a
GM 5005	20,30 a	69,46 a	83,42 a
CRT1	16,93 a	62,36 a	91,33 a
<b>Trigo</b>			
NI	3,4 a	7,7 a	32,6 b
WT	3,2 a	8,2 a	44,12 a
GM 5005	3,5 a	7,3 a	39,26 ab
CRT1	3,1 a	9,1 a	41,82 ab

**Tabla 1.1:** Puntos de entrada y porcentaje de micorrización de raíces de maíz y trigo inoculadas con *Azospirillum* a los tres tiempos de corte.

A los 7 días de la inoculación, ni el trigo ni el maíz presentaron diferencia alguna entre tratamientos en cuanto a la longitud de la raíz.

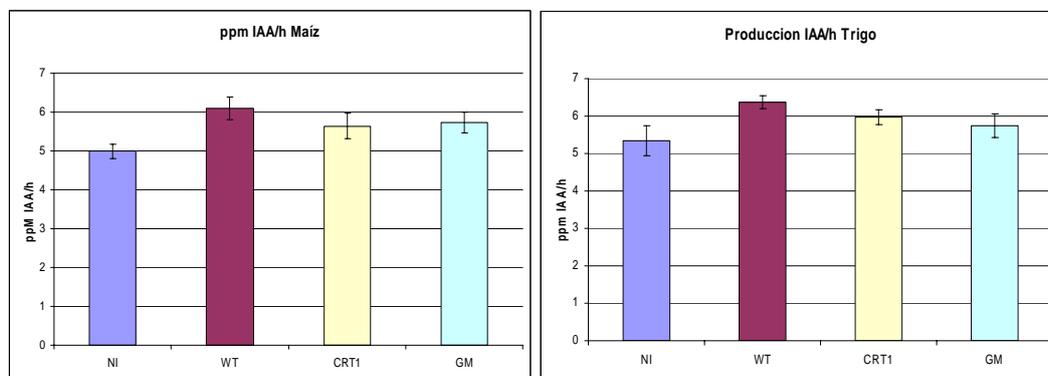
La raíz principal de las plantas a las 2 semanas no presentó diferencias en cuanto a la longitud, mientras que las raíces de 2° orden si se vieron afectadas en el caso del maíz. Ninguno de los tratamientos con *Azospirillum* presentó diferencias entre ellos. En maíz, mientras que las cepas GM y CRT1 mantuvieron valores similares a los del control, la cepa silvestre Sp245 resultó significativamente menor que el control. Respecto a la longitud radical total, se observó que las plantas inoculadas con la cepa Sp245 presentaban valores similares a los inoculados con las otras cepas pero inferiores a los del control no inoculado. A las 5 semanas de crecimiento, los tratamientos inoculados con *Azospirillum* presentaron una longitud radical total superior a los controles en ambas plantas, siendo la cepa GM la que más incrementó la longitud en trigo.

<b>cm</b>	<b>7 días</b>	<b>2 semanas</b>		<b>5 semanas</b>	
<b>Maíz</b>		<b>Raíz 1<sup>a</sup></b>	<b>Raíz 2<sup>a</sup></b>	<b>Total</b>	
Control	7,32 a	15,78 a	30,40 a	46,19 a	1141,00 b
WT	7,72 a	14,49 a	22,86 b	37,35 b	1370,53 a
GM	6,99 a	14,80 a	27,19 ab	41,99 ab	1300,08 a
CRT1	7,62 a	13,90 a	23,66 ab	37,56 ab	1347,78 a
<b>Trigo</b>					
Control	6,63 a	16,3 a	13,1 a	29,4 a	1323,97 c
WT	6,27 a	17,2 a	12,8 a	30 a	1785,01 b
GM	6,88 a	15,4 a	10,4 a	25,8 a	1978,35 a
CRT1	5,92 a	19,6 a	13,5 a	33,1 a	1903,63 ab

**Tabla 1.2:** Longitud radical (cm) de maíz y trigo inoculados con *Azospirillum* a los tres tiempos de corte.

En el presente experimento se determinó la capacidad de síntesis de AIA debido a la actividad enzimática de este suelo recuperado. La metodología para la determinación de AIA en suelo viene recogida en el punto 10.1 de Material y Métodos general.

Se obtuvieron los siguientes resultados.



**Figura 1.9:** producción de AIA en rizosfera de trigo y maíz inoculado con *Azospirillum*.

La producción de AIA en suelo se ve afectado por el tratamiento inoculado (Figura 1.9). Mientras que en el caso del maíz todos los tratamientos microbianos incrementaron la producción de AIA, en el caso de trigo este incremento con respecto al control sólo fue representativo con la cepa WT. El incremento en la producción de AIA no se vio reflejado en un incremento en la producción de biomasa ni de la parte aérea ni de la raíz, sin embargo si se observó que los valores mas altos de AIA determinados en suelo corresponden a un aumento en la longitud radical total tanto de maíz como de trigo. Los controles de las plantas de trigo presentan los menores valores de longitud radical, que coinciden con la menor producción de AIA en suelo de estos tratamientos.

### 1.3.4. Discusión

Discusión longitud radical e infección MA:

El género *Azospirillum* se caracteriza por ser una PGPR y aunque el modo de acción no se ha definido con exactitud, hasta el momento se asume que el mecanismo principal por el cual promueve el crecimiento vegetal es la mejora en la nutrición. Esto se debe al aumento del desarrollo radical provocado principalmente por la producción de auxinas (Okon, 1985). Los efectos producidos por *Azospirillum* dependen de varios factores como la concentración inoculada, la especie vegetal, momento de la inoculación y condiciones ambientales (Okon and Kapulnik, 1986). La concentración de inóculo aplicada parece ser la adecuada para ejercer un efecto sobre las plantas, ya que un exceso

en la concentración inoculada provoca efectos no deseados como la disminución en el área o longitud radical. En general, la aplicación de  $10^6$  a  $10^7$  UFC por semilla o planta es óptima (Okon y Vanderleyden, 1997).

En el primer análisis de las plantas (7 días), no se observó efecto sobre la longitud radical en ninguna de las plantas. Sin embargo, al cabo de 2 semanas la inoculación sí produjo efecto sobre la morfología de las plantas. Este efecto se ha visto en otros estudios realizados en tomate (Hadas & Okon, 1987), trigo (Kapulnik *et al.*, 1985; Okon and Kapulnik, 1986), maíz (Fallik *et al.*, 1994) y sorgo (Sarig *et al.*, 1988). El efecto observado a las 5 semanas se corresponde con los resultados presentados por otros autores (Hartmann *et al.*, 1983; Kapulnik *et al.*, 1985).

El incremento sobre la longitud radical total debido al aumento en la longitud de las raíces secundarias, demuestra una correcta colonización inicial, ya que si no se produce un establecimiento adecuado en la raíz, los efectos esperados por la inoculación, no se observarían (Hecht-Buchholz, 1998; Benizri *et al.*, 2001).

En la inoculación conjunta de *Azospirillum* y hongos MA se ha observado un efecto positivo sobre plantas de trigo (Al-Nihidh *et al.*, 1991), cebada (Negi *et al.*, 1990; Subba Rao *et al.*, 1985) o maíz (Barea *et al.*, 1983). Por otro lado, la planta no es la única que sufre un efecto. La presencia de un inoculante afecta a la biología y fisiología del otro. Esta interacción puede ser positiva como se ha descrito por Menze (1985) donde tras la inoculación de *Paspalum notatum* y *Panicum virgatum* con *Azospirillum* y *Glomus macrocarpum* se observa un incremento en la colonización del hongo por efecto de la bacteria. En otro estudio llevado a cabo por Pakovsky (1989) en maíz, se describe un aumento en la biomasa tanto intra como extrarradical del hongo MA.

Se ha sugerido que la capacidad de *Azospirillum* de incrementar el desarrollo de los hongos MA en la rizosfera es debida a la producción de sustancias promotoras del crecimiento como las auxinas (Okon, 1985). Esto explicaría que los mayores valores de síntesis de AIA en suelo y el aumento en la micorrización se correspondan con los tratamientos inoculados con *Azospirillum* (Figura 1.9, tabla 1.2).

## ***2. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* en interacción con poblaciones naturales de hongos MA***

### ***2.1. Efectos sobre el crecimiento vegetal, colonización y actividad MA, la comunidad bacteriana de la rizosfera y actividades enzimáticas del suelo***

#### ***2.1.1. Introducción***

Como es sabido, muchas bacterias del suelo que viven asociadas a las raíces de las plantas contribuyen al desarrollo y crecimiento de estas, es decir, actúan como PGPR. Sin embargo, algunas de esas PGPR, que existen de forma natural en la mayoría de los suelos, no siempre se encuentran presentes a niveles significativos para ser eficientes. Este hecho justifica ciertas estrategias biotecnológicas que pueden ser desarrolladas para optimizar los efectos de las PGPR sobre las plantas, cual es el uso de inoculantes bacterianos. Particularmente, uno de las PGPR “diana” son las especies de *Azospirillum*.

Se reconoce que los efectos beneficiosos de la inoculación con *Azospirillum* sobre el crecimiento y nutrición vegetal se deben a cambios en la fisiología y morfología del sistema radical, lo que permite mejorar la adquisición de agua y nutrientes minerales por parte de la planta (Okon & Kapulnik, 1986; Dobbelaere *et al.*, 1999). Sin embargo, no se puede descartar que tales cambios en la arquitectura y actividad del sistema radical, puedan afectar las poblaciones microbianas autóctonas asociadas a la raíz, lo que podría afectar indirectamente a la planta (Corich *et al.*, 1995; Basaglia *et al.*, 2003). Los avances en la biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas técnicas para el estudio de comunidades bacterianas. El estudio mediante el análisis RISA (rRNA Intergenic Spacer Analysis), de la región IGS entre las subunidades pequeña (16s) y grande (23s) se ha convertido en una herramienta muy útil para su estudio (Ranjard *et al.*, 2001). El efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre otras poblaciones que componen la comunidad rizosférica ha sido poco estudiado, a pesar de la repercusión que puede tener sobre los ciclos de nutrientes, salud vegetal etc... Investigar dichos efectos se hace mas importante en el caso del uso de inoculantes modificados genéticamente (Morrissey *et al.*, 2002). Particularmente, el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre los hongos MA adquiere un especial interés.

En el contexto de las interacciones de las PGPR y de los hongos MA destacan la que conduce al establecimiento de una micorrizosfera funcional (Barea *et al.*, 2005). En efecto, las PGPR, ya estén presentes de forma natural o sean introducidas como inoculante, puede afectar al desarrollo y actividad de los hongos MA (Germida & Walley, 1996). Las poblaciones microbianas pueden

interaccionar con los hongos MA de forma positiva o negativa (Gryndler, 2000). Un efecto típico es el ejercido por las bacterias denominadas “Mycorrhiza-Helper-Bacteria” (MHB) capaces de estimular el crecimiento del micelio y/o mejorar la formación de la micorriza (Garbaye, 1994; Gryndler, 2000; Barea *et al.*, 2004; Johansson, 2004). Los microorganismos rizosféricos de tipo MHB producen compuestos capaces de incrementar los niveles de exudados radicales o sintetizar fitohormonas, lo que puede estimular el micelio fúngico en la rizosfera y facilitar la penetración del hongo en la raíz afectando al establecimiento de la micorriza (Azcón-Aguilar & Barea, 1992).

Es de suponer que la manipulación genética dirigida de determinadas características inherentes de un microorganismo, para dar lugar a cepas GM, podría representar una mejora de sus efectos beneficiosos sobre la planta. No obstante, es posible que la interacción de ese organismo GM con otros microorganismos que de forma natural habitan la rizosfera resulten afectados, por lo que parece lógico investigar dichos efectos indirectos. Dado que la formulación de inoculantes basados en organismos beneficiosos es una práctica cada vez mas frecuente, así como la tendencia a utilizar microorganismos GM, es necesario comprobar no solo el efecto que tienen sobre la planta sino sobre los microorganismos beneficiosos con los que va a interaccionar. Esto es particularmente relevante en el caso de los hongos MA.

Para investigar el impacto de cualquier factor, sea biótico como abiótico, sobre la formación de las MA es preciso disponer de un método eficaz para visualizar la colonización del hongo MA y, particularmente, la vitalidad del hongo en la raíz. Los procedimientos de tinción de estructuras fúngicas tales como los basados en azul tripán, fuchina ácida o el negro de clorazol, no son capaces de distinguir entre las estructuras metabólicamente activas y las inactivas. En este sentido, la presencia de determinadas actividades enzimáticas en el micelio externo o interno del hongo puede ser útil como marcador de la funcionalidad de las MA (Gianninazi-Pearson *et al.*, 1995). Estas actividades se ponen de manifiesto por medio de las llamadas “tinciones vitales”. Dos de las mas utilizadas son la que marca la succinato deshidrogenasa (SDH), enzima implicada en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que indica la vitalidad del hongo MA y la actividad fosfatasa alcalina (ALP), implicada en la transferencia de P del hongo a la planta (Smith & Dickson, 1991; Saito *et al.*, 1993; Tisserant *et al.*, 1993; Guillemin *et al.*, 1995; Boddington & Dodd, 1999; Van Aarle, 2001, 2005).

Existen diferentes métodos para la detección de la ALP. Tradicionalmente se ha venido usando el método de tinción del Fast Blue RR Salt (Tisserant *et al.*, 1993) donde se aprecian los lugares donde existe actividad. Estudios recientes han demostrado una mayor sensibilidad cuando se emplea el Sustrato ELF (Molecular Probes) pudiendo observarse al microscopio de fluorescencia la actividad ALP localizada en hifas intrarradicales y arbusculos (Van Aarle, 2001).

### Actividades enzimáticas del suelo: SDH, $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa

En los últimos años se ha incrementado el interés por el papel que desempeñan las enzimas del suelo como indicadores de la calidad del mismo. En este sentido, el estado microbiológico y bioquímico de un suelo puede afectarse por el cambio en la composición de las poblaciones microbianas, por lo cual se ha propuesto como un indicador fiable y rápido del estado biológico de suelos, tanto en sistemas naturales como en agrosistemas (Dick & Tabatabai, 1993b). La determinación de ciertas actividades enzimáticas, junto con el uso de parámetros agroquímicos tradicionales, parece ser uno de los mejores métodos para evaluar el estado de la actividad microbiana del suelo y para comprender la respuesta del mismo a diferentes prácticas de cultivo, enmiendas o cambios ambientales (Nannipieri *et al.*, 1990). En cualquier caso hay que apuntar que el análisis de actividades enzimáticas concretas no refleja el nivel de actividad microbiana del suelo, ya que las enzimas son específicas de un determinado sustrato y están relacionadas con reacciones particulares. Por tanto, la medida simultánea de varias actividades enzimáticas en el suelo puede ser mucho más válida e ilustrativa que la determinación de una sola actividad para estimar la actividad microbiológica total del mismo y la dinámica de nutrientes, así como la respuesta a prácticas de cultivo, estreses ambientales y cambios en las condiciones climáticas (Nannipieri *et al.*, 1990). En este sentido, Ceccanti *et al.*, (1994), proponen el uso de una oxido-reductasa (deshidrogenasa) y de una serie de hidrolasas (fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa) para evaluar con precisión y rapidez los efectos de diferentes prácticas de cultivo. Los resultados del estudio de estos grupos enzimáticos se relacionan con diferentes propiedades del suelo: nivel de fertilidad biológica, transformación metabólica de macrocompuestos en compuestos minerales simples y presencia de nutrientes disponibles para la planta.

*Actividad deshidrogenasa:* es un factor de numerosas enzimas y funciona solo intracelularmente (Nannipieri *et al.*, 1990). Su actividad representa la energía transferida a través de la cadena respiratoria. Por esta razón, la actividad deshidrogenasa en suelo es un índice de la actividad microbiana global del mismo. *Actividad fosfatasa:* la asimilación del fósforo para las plantas depende en gran parte de la mineralización que experimenten las diferentes fracciones de dicho fósforo unidas a las formas orgánicas. Las enzimas fosfatasas son las encargadas de hidrolizar el fósforo en forma orgánica (ésteres de fosfato) hasta formas inorgánicas, haciéndolo por tanto asimilable para las plantas. Ésta es una enzima inducible por su sustrato (Burns, 1982).

*Actividad  $\beta$ -glucosidasa:* La enzima  $\beta$ -glucosidasa está involucrada en el desarrollo del ciclo del carbono en el suelo, y se encarga de catalizar reacciones de hidrólisis de cadenas no reducibles de b-D-glucósidos para formar b-glucosa. Esta enzima refleja el estado de la materia orgánica en el suelo y todos los procesos que tengan lugar en ella, desde mineralización hasta la humificación (Hayano & Tubaki, 1985). Ésta es una enzima inducible por su sustrato (Burns, 1982).

### 2.1.2. *Material y Métodos específicos*

#### **Diseño experimental, Material biológico y Determinaciones**

En el proyecto ECO-SAFE se han diseñado dos modificaciones genéticas por la que se han obtenido dos bacterias GM. De esta manera, el experimento que se plantea tiene como objetivo, determinar cual de las dos bacterias debe ser seleccionada para proseguir con los estudios en el marco del proyecto.

En este experimento se trató de averiguar el efecto de los inoculantes GM sobre la biomasa de plantas de trigo, colonización, actividad y potencial residual de propágulos de hongos MA. En vista de los resultados obtenidos y los resultados de los otros miembros del Consorcio ECO-SAFE, se decidió con cuál de las dos cepas GM se continuarán los demás experimentos (*A. brasilense* pFAJ5005)

El experimento se diseñó utilizando macetas de 3,3 L de capacidad que contenían 3 kg con suelo provisto de los hongos MA naturalmente presentes en ese suelo. Los tratamientos microbianos que se emplearon fueron *A. brasilense* Sp 245 (WT), *A. brasilense* pFAJ5002 (GM), *A. brasilense* pFAJ5005 (GM), *A. lipoferum* CRT1 (WT) y un control No Inoculado (NI). El experimento consistió en 7 repeticiones, con 5 plantas por maceta.

La planta experimental utilizada fue el trigo (*Triticum aestivum* var. Rubino). Las semillas pregerminadas (2.1 de Material y Métodos General) se transfirieron a las macetas con el sustrato. Se dispusieron en las esquinas de un cuadrado imaginario y una plántula en el centro de la maceta. A continuación se añadió el inóculo microbiano según se describe en 4.1 de Material y Métodos General.

Las plantas se cosecharon a las 8 semanas de crecimiento. Una vez cosechadas se determinó el peso seco de la parte aérea y raíces tras secar las plantas a 65°C durante 48h. Inmediatamente después de extraer la raíz de la maceta y pesarla, se tomó una alícuota de la misma para proceder a la determinación de la actividad fosfatasa alcalina mediante el método de tradicional (Fast Blue RR) y el método ELF (fluorescente) y de la succinato deshidrogenada (hongo vivo). Esta alícuota se pesó y el dato se incluyó posteriormente en los cálculos de peso seco de la raíz. Tras pesar la raíz, se procedió a tomar una porción para la determinación del % de micorrización mediante la tinción de las estructuras fúngicas intrarradicales con Azul Tripan.

El suelo rizosférico se recuperó y se empleó para la determinación del potencial micorrízico residual tras el cultivo del trigo. Esta determinación se realizó según el método del Número Mas Probable (ver 6.4 de Material y Métodos).

La metodología de la determinación de las actividades enzimáticas en suelo se describe en el apartado 10 de Material y Métodos generales.

#### **2.1.2.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (PAL)**

La actividad fosfatasa alcalina se determinó inmediatamente después de extraer las raíces de la maceta para evitar la pérdida de actividad. Se utilizó el sistema ELF-97<sup>®</sup> (Molecular Probes). Para ello, se tomó una alícuota de cada raíz, disponiéndolas individualmente en tubos ependorff de 1.5ml con tampón PBS - Tween 20, pH 8 durante 10 min, para permeabilizar las muestras. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS durante 5min y a continuación se montaron las raíces en un portaobjetos.

Para comprobar tanto el tiempo de incubación como la dilución mas adecuada para la visualización de la reacción ELF en las raíces de trigo, se procedió previamente a usar diluciones 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40 durante 10, 30, 60 y 120 min.

Una vez montadas se añadió 20µl/lámina del sustrato fluorescente durante 2 horas, en una relación 1:30 de componente A (sustrato fluorescente) y componente B (buffer de detección), el cual se reconstituyó al momento de usarse.

Finalmente se lavaron cuidadosamente las raíces, para así eliminar el precipitado fluorescente del sustrato.

#### **2.1.2.2. Succinato Deshidrogenasa (SDH)**

La actividad SDH se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Smith & Gianinazzi-Pearson (1990). Las raíces se sumergieron en una solución fresca que contenía 0.2M Tris-ClH, pH 7; 2.5M Succinato sódico·6H<sub>2</sub>O, 4mg/ml de nitroblue (azul) de tetrazolio y 5mM MgCl<sub>2</sub>. Los fragmentos de raíces se tiñeron durante la noche a temperatura ambiente y finalmente se aclararon durante 10-15 min. en una solución al 3% de lejía comercial. Los fragmentos de raíz se dispusieron en portas de la misma manera que las raíces teñidas con azul tripan y se cuantificó el % de raíz que presentaba actividad.

#### **2.1.2.3. Análisis RISA**

El análisis molecular se realizó sobre el ADN total extraído del suelo rizosférico correspondiente a la zona de ramificación, donde predominan los pelos radicales próxima a la zona apical de la raíz.

El ADN se amplificó con los cebadores descritos en Tabla 3 de Material y Métodos General. Se tomaron 20µl de producto de PCR que se cargaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida (37:5) al 5%. El gel se corrió en 1x TBE durante 12h a 60V y 5mA. Los geles se tiñeron con SYBR Green I según las instrucciones del fabricante. El patrón de bandas resultante se digitalizó y el negativo de la foto se

empleó para generar una matriz para cada comunidad bacteriana. Los parámetros para generar dicha matriz fueron la presencia o no de banda y la intensidad de las mismas. Las matrices fueron analizadas usando PCA (PCA, STATBOX software, Grimmer Logiciels, 1997, Paris, France).

### 2.1.3. Resultados

#### 2.1.3.1. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre la producción de biomasa por plantas de trigo

La inoculación de *Azospirillum* incrementó significativamente la producción de biomasa (parte aérea) en las plantas de trigo, siendo CRT1 la cepa más efectiva. Sin embargo la inoculación no afectó significativamente el peso de la raíz

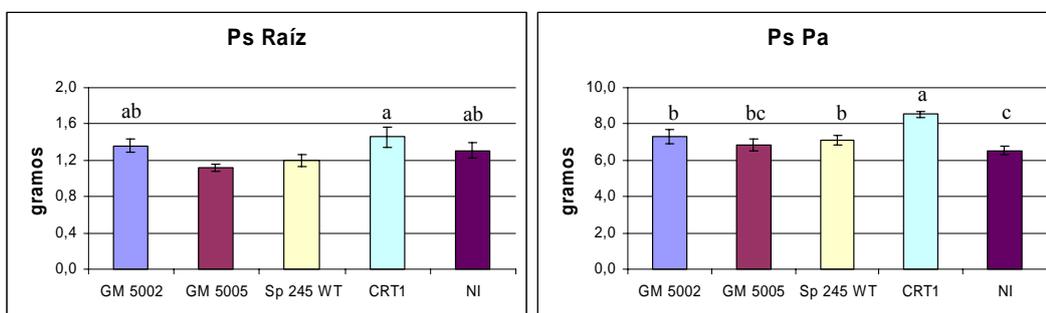


Figura 2.1: Biomasa de las plantas de trigo inoculadas con las diferentes cepas de *Azospirillum*

#### 2.1.3.2. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre la formación de las MA

La inoculación con *Azospirillum*, tanto las cepas WT como las GM afectaron positivamente el porcentaje de micorrización de las plantas de trigo, comportándose como MHB.

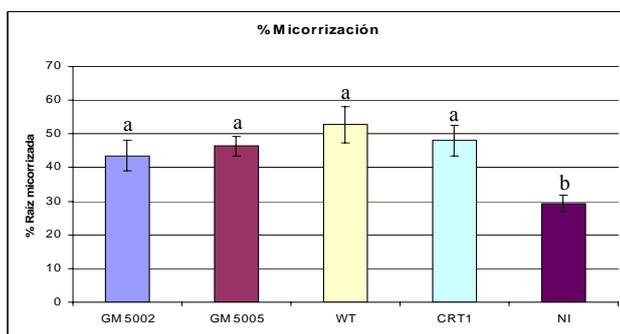
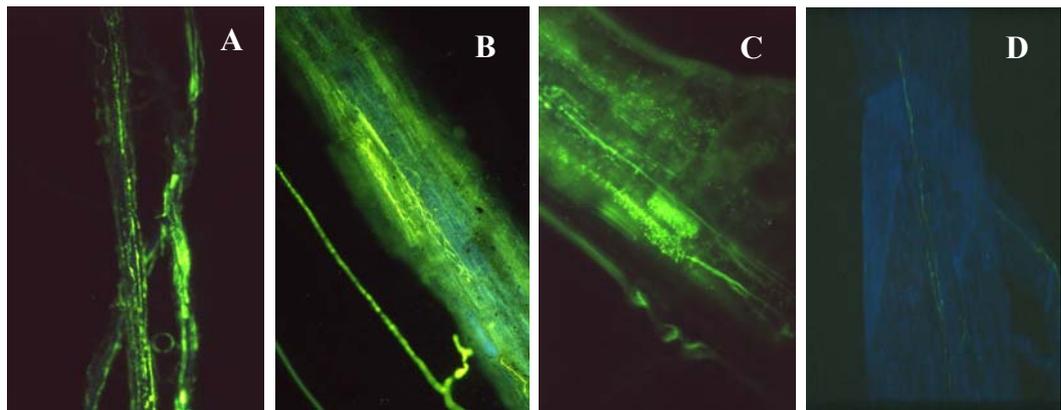


Figura 2.2: Micorrización de las plantas de trigo inoculadas con *Azospirillum*

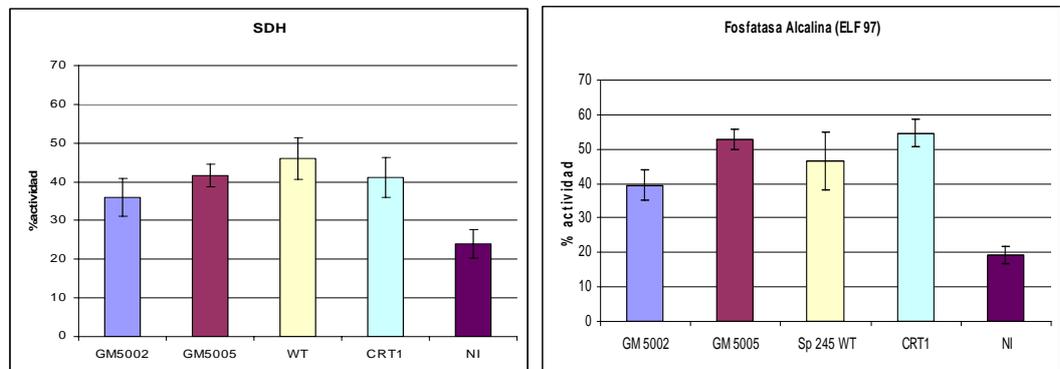
Los valores de micorrización de las plantas de trigo fueron relativamente altos (Russo *et al.*, 2005). Estos valores llegaron incluso al 53% cuando se trató de plantas inoculadas con *Azospirillum* mientras que el control presentó valores del 30%. Es obvio que la modificación genética de *Azospirillum* no afectó negativamente la formación de MA.

### 2.1.3.3. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre la actividad PAL

El uso de un sustrato fluorescente sirvió para determinar la actividad fosfatasa alcalina de los hongos MA. En la Fig 2.3 se observa un precipitado fluorescente en los lugares donde existe actividad.



**Figura 2.3:** Imágenes de fluorescencia DAPI de actividad fosfatasa alcalina por el método ELF 97<sup>®</sup> en raíces de trigo. (A) Micelio extrarradical sobre la raíz. (B) Micelio intrarradical e hifa extrarradical. (C) Hifa intrarradical y arbusculo. (D) Raíz no micorrizada.



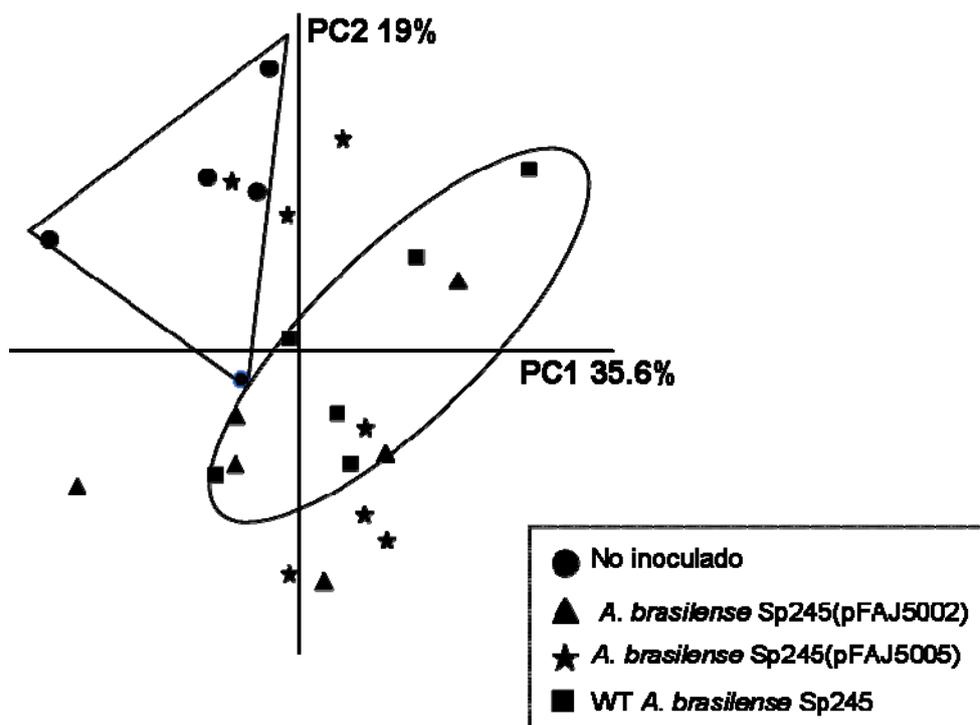
**Figura 2.4:** Tinciones vitales de las raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum*. (A) Tinción de succinato deshidrogenasa; (B) fosfatasa alcalina mediante el método ELF<sup>®</sup>.

Se observó que la PAL dependiendo del inoculante empleado. Todos los tratamientos *inoculados* con *Azospirillum* incrementaron dicha actividad con respecto al control sin inocular. Dentro de los tratamientos con *Azospirillum* se

observaron diferencias significativas de las cepas GM5005 y CRT1 con la cepa GM5002, mientras que estas mantenían valores no diferenciales con la cepa silvestre Sp245.

Los valores de la actividad PAL determinada por el método ELF fueron ligeramente superiores a los determinados mediante la tinción por medio del Fast Blue RR Salt. Estos valores aunque menores mantuvieron la tendencia descrita para la determinación con el sustrato fluorescente.

#### 2.1.3.4. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre las poblaciones microbianas del suelo

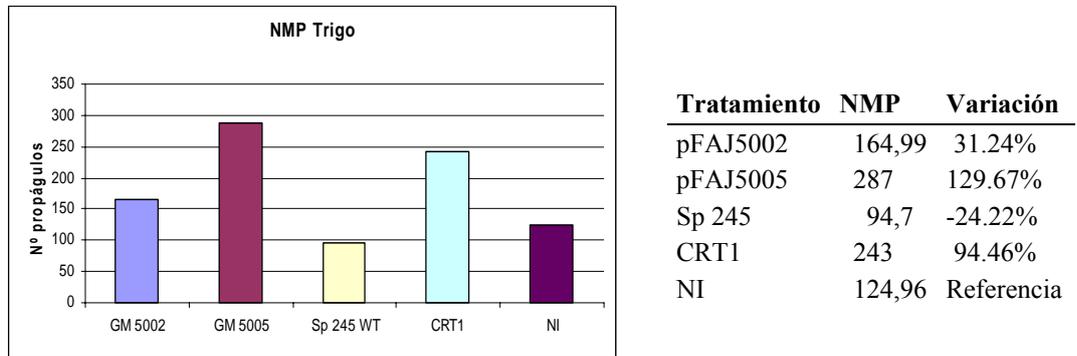


**Figura 2.5:** Análisis de los componentes principales de la comunidad bacteriana de la rizosfera de trigo inoculado con *Azospirillum*.

El análisis de la diversidad de las bacterias rizoféricas en las plantas no difirió por la inoculación de la cepa WT o de las GM. Sin embargo, la inoculación de las plantas de trigo sí causó un impacto sobre la comunidad bacteriana cuando se trató de la cepa WT Sp245 y la GM Sp245(5002), mientras que la cepa GM Sp245(5005) no tuvo impacto sobre esta. Es importante indicar que el cambio producido por la bacteria GM fue similar al producido por la cepa WT, siendo este impacto, un cambio cuantitativo pero no cualitativo en la comunidad bacteriana de la rizosfera

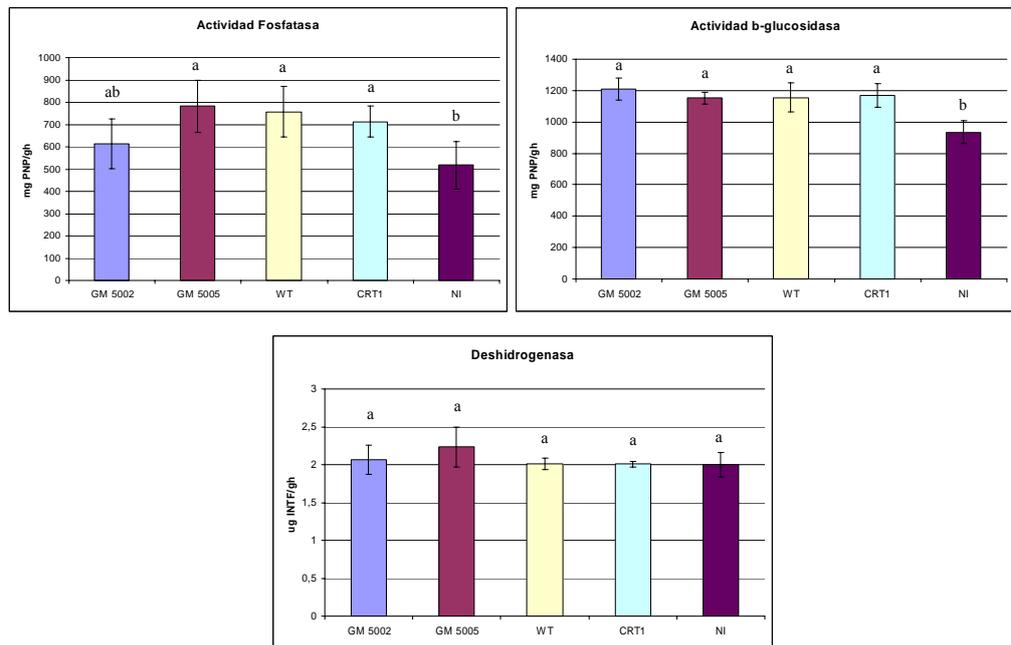
### 2.1.3.5. Potencial micorrícico residual del suelo.

La determinación del potencial micorrícico del suelo rizosférico recuperado del ensayo reveló diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. La inoculación con la cepa GM5005 fue la que más incrementó el número de propágulos infectivos y junto con el tratamiento CRT1 presentó diferencias significativas con respecto al resto de suelos recuperados del tratamiento sin inocular.



**Figura 2.6:** Potencial micorrícico del suelo determinado como NMP de propágulos en 50g de suelo.

### 2.1.3.6. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre actividades enzimáticas del suelo



**Figura 2.7:** Actividad fosfatasa,  $\beta$ -glucosidasa y deshidrogenasa en el suelo rizosférico recuperado del experimento.

La actividad microbiana del suelo rizosférico, estimada como actividad deshidrogenasa, resultó afectada por la inoculación de las cuatro cepas de *Azospirillum* (Figura 7). Sin embargo, la actividad hidrolítica del mismo, referente a los ciclos del carbono ( $\beta$ -glucosidasa) y del P (fosfatasa alcalina), aumentó al ser inoculado el suelo por GM 5005, y las dos cepas WT en el primer caso y por las cuatro cepas en el segundo.

#### **2.1.4. Discusión**

La inoculación de *Azospirillum* normalmente afecta a la arquitectura radical, incrementando la ramificación de la raíz y aumentando la densidad de pelos radicales. (Okon y Vanderleyden, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no muestran este incremento.

No siempre el efecto observado sobre la biomasa de las plantas tras la inoculación de *Azospirillum* ha sido claramente positivo. Aunque los valores más altos de peso radical se obtuvieron en las inoculaciones de CRT1 y GM5002, estos valores no fueron significativos con respecto al control. El hecho de que el peso radical no se incremente no implica que la bacteria no haya tenido efecto. Como se vio anteriormente (capítulo 1), la longitud radical de las plantas inoculadas es superior al de los controles. Esto puede ser debido a que incrementa el desarrollo de las raíces secundarias y terciarias, mucho más finas. Este efecto, incrementa el volumen de la raíz pero a su vez impone una carga grande sobre la planta que reduce relativamente su biomasa (Fitter, 1996).

En este estudio, el efecto observado sobre la comunidad bacteriana no implicó un cambio cualitativo de la composición de la diversidad sino cuantitativo. Es posible que la inoculación de *Azospirillum* haya producido una alteración en la composición de exudados radicales y la longitud radical. Teniendo en cuenta los resultados observados en el capítulo anterior donde si se observaba un incremento en la longitud de la raíz es posible que los límites de la zona rizosférica se hayan incrementado. Por esta razón se han podido incorporar a dicho hábitat microorganismos que no estaban inicialmente influenciados. Puesto que la distribución microbiana en suelo es heterogénea, su inclusión en la rizosfera puede producir las diferencias cuantitativas descritas en la comunidad microbiana. Por último no se puede descartar la posibilidad de un efecto inhibitorio directo por *Azospirillum* sobre algún componente de la comunidad bacteriana ya establecido que haya podido incrementar el desarrollo de otro (Bashan & de Bashan, 2002).

El efecto de *Azospirillum* sobre la biomasa de trigo fue positivo independientemente de la cepa aplicada, hecho ampliamente recogido en la bibliografía (Lucy *et al.*, 2004).

La inoculación con las cepas *Azospirillum* incrementó el nivel de micorrización de las plantas. Este efecto no fue el único efecto positivo que se observó sobre las MA. La actividad fosfatasa alcalina, que mide la funcionalidad de los hongos y la SDH (vitalidad del hongo) también incrementaron en plantas

inoculadas con *Azospirillum*. Estos efectos ya se habían insinuado antes (Fages, 1994) hacen que pueda proponerse a *Azospirillum* como MHB.

El hecho de que la longitud radical incrementa puede influir positivamente sobre la colonización radical, incrementando la probabilidad de que las hifas exploradoras de los hongos MA encuentren una raíz que colonizar. El incremento en la colonización, actividad y vitalidad del hongo podrán influir en otros aspectos del ciclo vital del hongo como la producción de propágulos en forma de esporas. Las bacterias GM 5005 y CRT1 incrementaron considerablemente la producción de propágulos. Esto podría explicarse por el desarrollo radical que aunque en valores de peso seco no se observaron grandes diferencias (incluso GM 5005 disminuyó) la longitud de las raíces secundarias fue considerablemente superior en ambos tratamientos (capítulo 1, tabla 1.2).

La cantidad de propágulos expresado en términos de infectividad, incrementó en presencia de *Azospirillum* ssp. Los resultados resaltan la importancia de las especies empleadas como inoculantes en la viabilidad de los hongos micorrícicos. En condiciones naturales resulta muy importante que los propágulos de los hongos queden en forma viable de una cosecha a otra. Además, incremento del potencial residual micorrícico del suelo, es crítico para el establecimiento de posteriores plantas y mejora en el crecimiento de las mismas. En este caso, el potencial infectivo del suelo incrementó tanto por las cepas GM (31.24% por pFAJ5002 y 129.67% por pFAJ5005) como por la cepa CRT1 (94.46%).

Los resultados observados en las actividades enzimáticas del suelo ponen de *manifiesto* el aumento de glucósidos y ésteres-P disponibles en los suelos inoculados con respecto al no inoculado. Los incrementos en los sustratos inducirían la síntesis de ambas enzimas, ya que estas enzimas son inducibles por sustrato (Burns, 1982). El origen de los sustratos que inducirían la síntesis de las enzimas hidrolíticas, podría estar vinculado tanto a la materia orgánica del propio suelo y/o a un posible incremento en los exudados radicales o del micelio externo. Se ha descrito que *Azospirillum* es capaz de disminuir el pH del suelo (Carrillo *et al.*, 2002). Esta disminución del pH, podría ser causa indirecta del incremento de P disponible (Joner & Johansen, 2000; Villegas & Fortín, 2002) y aumentar la actividad fosfatasa del suelo (Burns, 1982).

## **2.2. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre la producción de grano**

### **2.1.1. Introducción**

La manipulación genética de microorganismos beneficiosos, con funciones biofertilizantes o fitoestimulantes, con el fin de mejorar o incrementar determinadas características propias o ajenas conduce a la obtención de inoculantes más eficaces. La biotecnología correspondiente se ha aplicado a las especies de *Azospirillum* dada la capacidad de estas bacterias para mejorar el crecimiento y la cosecha de numerosas especies vegetales de gran importancia agronómica y ecológica (Dobbeleare *et al.*, 2001). Desde el redescubrimiento de este género a mediados de los 70, se ha probado que es una PGPR muy prometedora, pero que produce resultados diversos. De hecho se ha descrito en numerosos casos un incremento sustancial en la cosecha de cereales (hasta un 30%) en condiciones de campo e incluso mayor en condiciones de invernadero (Dobbeleare *et al.*, 2001). A pesar de los numerosos resultados positivos descritos, la inoculación de *Azospirillum* se asocia a resultados impredecibles e inconsistentes, los cuales restringen su uso como inoculante comercial a gran escala (Dobbeleare *et al.*, 2002 *biol. fert. Soil*). Los factores responsables de esta respuesta irregular son difíciles de discernir, pero generalmente se atribuyen a la variabilidad de los factores ecológicos y medioambientales, las condiciones físicas y químicas del suelo, a las características genéticas de las cepas y cultivos empleados y a la competición con la microflora autóctona para establecerse en la rizosfera.

En este experimento, se ha evaluado el efecto de la inoculación tanto de las cepas *silvestres* como la GM en la producción de grano de cultivos de maíz y trigo. Para ello, las plantas completaron su ciclo vital hasta la senescencia y producción de grano.

### **2.1.1. Materiales y Métodos**

#### **Diseño Experimental**

Para la realización de este experimento se emplearon macetas capaces de contener 25kg con suelo. Este substrato se utilizó natural, tamizado con una luz de maya de 4mm que, para evitar su compactación, se mezcló con perlita en una relación de 4:1 (v:v). Se sembraron 10 semillas de trigo y 1 semilla de maíz por maceta. Las semillas se inocularon con cultivos de las siguientes cepas de *Azospirillum*: *A. brasilense* Sp 245 (WT), *A. brasilense* pFAJ5005 (GM), *A.*

*lipoferum* CRT1 (WT). La inoculación de *Azospirillum* se describe en el punto 4 de Material y Métodos. Se incluyeron un tratamiento fertilizado con N y otro no inoculado ni fertilizado (NI). El tratamiento fertilizado recibió un aporte de N (2400mg por maceta ) equivalente a 60Kg/ha.

Las plantas *de* trigo se cultivaron en cámara de cultivo, dado que el tamaño de la planta permite su cultivo en esas condiciones controladas., mientras que las de maíz se cultivaron en ambiente natural, disponiendo las macetas como muestra la Figura 2.8.

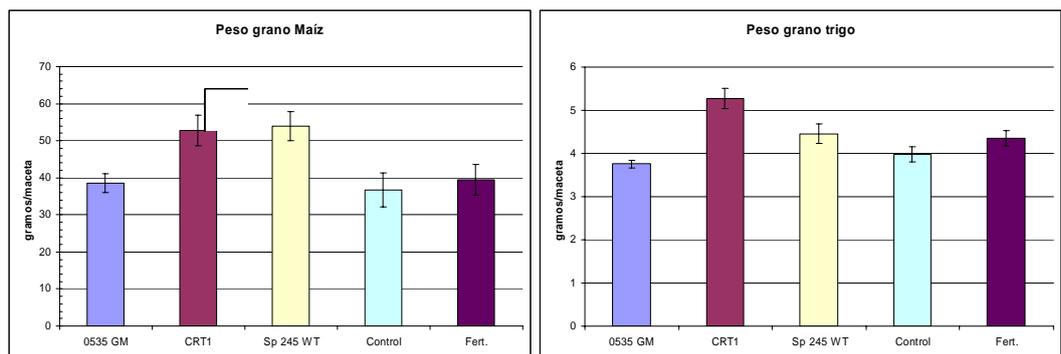
Tras la senescencia de las plantas, se procedió a recoger tanto las espigas de trigo como las *mazorcas* de maíz. El grano de cada una de las plantas se extrajo y se determinó el peso producido por maceta, Así como los contenidos de N, P y K en grano de trigo.



**Figura 2.8:** Ensayo de producción de grano. El suelo recuperado de las macetas se empleó para la determinación de la diversidad de hongos MA.

### 2.1.1. Resultados (Experimento 2.2)

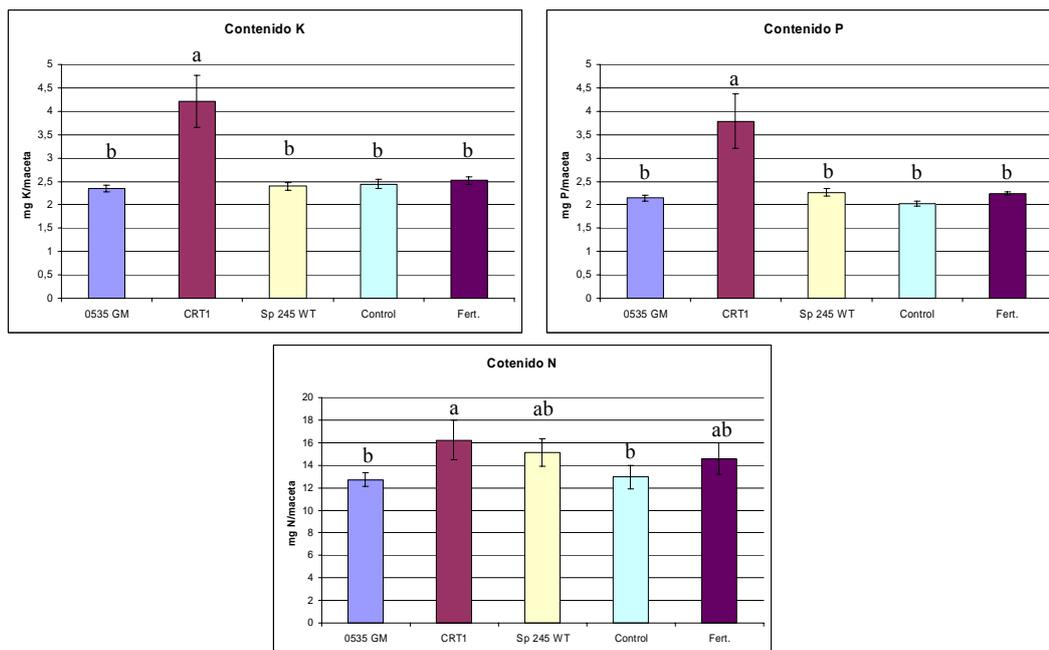
Los datos de peso de grano cosechado se recogen en la Figura 2.9.



**Figura 2.9:** producción de grano en cultivos de trigo y maíz inoculados con *Azospirillum*. Los datos se expresan en g por maceta.

En trigo, CRT1 fue el único tratamiento que produjo efectos significativos, mientras que en maíz las dos cepas WT (CRT1 y Sp 245) produjeron mayor cosecha que ninguno de los otros tratamientos, los cuales no produjeron diferencias significativas entre ellos. En trigo, mientras que la cepa GM se comportó como el control sin inocular e inferior al resto de tratamientos, la cepa Sp245 produjo un peso de grano similar tanto al del control como al del fertilizado.

En la Figura 2.10 se resumen los datos sobre el contenido en N, P y K en grano



**Figura 2.10:** Contenido NPK de grano producido por plantas de trigo inoculado con las diferentes cepas de *Azospirillum*- SIGNIFICACIÓN

Las cepas silvestres produjeron un incremento en el contenido de N en el grano.

El grano del tratamiento CRT1 acumuló una cantidad de N equiparable al tratamiento suplementado con N y superior al control sin suplementar. Dicha cepa también incrementó el contenido en P y K mientras que no se observaron diferencias entre el resto de tratamientos.

### 2.1.1. *Discusión*

Es evidente que la inoculación de las cepas WT de *Azospirillum* producen un efecto positivo en la producción de grano. Es obvio que los cambios producidos por la inoculación de estas bacterias en la micorrizosfera (Capítulo 1), que hacen que la planta pueda explorar un volumen mayor de suelo, podrían justificar los incrementos producidos sobre la cosecha

El efecto de la inoculación de la bacteria se ha visto que es mas acusado en suelos con niveles medios y bajos de fertilización (Dobbelaere, 2002). En el experimento, la aplicación de N, a dosis equivalentes a 60kg ha<sup>-1</sup> produjo una cosecha similar (aunque algo superior) a los controles en ambas plantas lo que indica que la cantidad de N aplicada en este suelo no es suficiente para producir un claro efecto. La inoculación de *Azospirillum lipoferum* CRT1 incrementó la los contenidos en N, P y K posiblemente debido al aumento en la superficie radical que permite una mayor adquisición de nutrientes. Por otro lado, cómo se vio en el Capítulo 2.1, tanto la actividad fosfatasa alcalina del suelo como la del hongo, incrementaron en los tratamientos inoculados. Esto puede justificar el aumento en el contenido en P producido por CRT1.

La disponibilidad de N en el suelo es uno de los factores limitantes en la producción de sistemas vegetales. La capacidad observada en *Azospirillum* para compensar esta deficiencia nutricional y reducir los niveles de aplicación de N para mantener la producción, la ha convertido en objeto de continuo estudio. Se ha determinado que sólo un 50% del N aplicado al cultivo es utilizado por la planta, el resto se pierde o por desnitrificación o por lixiviación, lo que provoca importantes problemas tanto de salud como medioambientales (Dobbelaere *et al.*, 2002). El mantenimiento de la producción por la inoculación de *Azospirillum* puede disminuir el aporte de N con el beneficio económico y medioambiental que ello conlleva.

La diferente respuesta de la inoculación puede tener su origen en las diferentes características de ambas cepas. En otros ensayos realizados con *A. brasilense* Sp245 y *A. irakense* KBC1 se demuestra que los efectos de ambas bacterias pueden llegar a diferir notablemente, probablemente debido a las diferencias en las síntesis de auxinas y citoquinas (Dobberlaere *et al.*, 2002), siendo cada una mas efectiva en determinados parámetros , dependiendo de la especie vegetal.

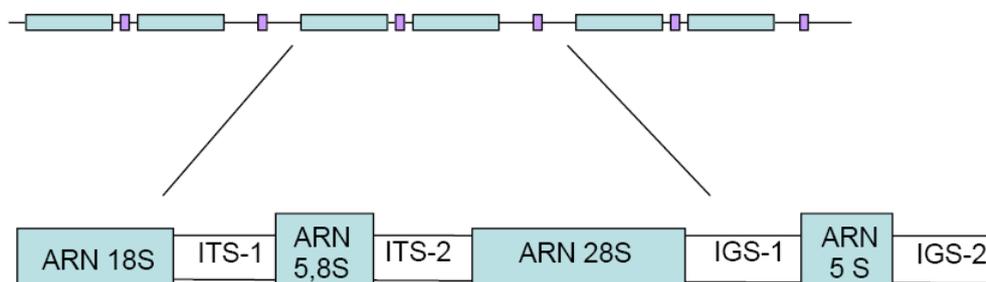


### 3. Impacto de la inoculación de *Azospirillum* Wt y GM sobre La diversidad DE los hongos MA naturalmente presentes en el suelo objeto de estudio.

#### 3.1. Introducción

Una vez estudiado (Capítulo 2) el impacto de inoculantes de *Azospirillum* (WT vs GM) sobre las poblaciones autóctonas de microorganismos del suelo, y, dada la importancia de los hongos MA se hace necesario el estudio del impacto de *Azospirillum* (WT vs GM) sobre dichos hongos. Hasta hace poco, para determinar la composición de una comunidad de hongos MA, la única herramienta disponible era la determinación de las características morfológicas de las especies presentes. Sin embargo, la identificación de hongos MA basados en criterios morfológicos plantean ciertas dificultades, aunque aún vigentes y útiles, cada vez se hace más crítico el uso de técnicas moleculares con fines de caracterización y ubicación filogenética de dichos hongos (Barker *et al.*, 2002; Redecker *et al.*, 2002, Schüßler, 2002).

La mayoría de las técnicas moleculares al uso se centran en genes ribosómicos concretos de estos hongos y normalmente sólo se han utilizado sobre hongos de colección, aunque cada vez se implementa más su aplicación a poblaciones naturales. Recientemente se ha comenzado a identificar los hongos que se encuentran colonizando las raíces (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Cornejo *et al.*, 2004), lo cual representa un avance considerable para conocer los integrantes de la población que realmente pueden ser operativos en el momento en que se hace la determinación. Entre los genes más empleados en este tipo de estudios se encuentran los que codifican para el ARN ribosómico (ADNr), las unidades de ADNr están compuestas de varios tipos de regiones: tres regiones codificadoras muy conservadas (18S, 5,8S y 28S) así como a regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS) que presentan cierto grado de variación y las regiones intergénicas (IGS), que son muy variables (Figura 5).



**Figura 3.1.** Unidad repetitiva de ADNr en eucariotas

A pesar de que el desarrollo de las técnicas moleculares ha supuesto un paso adelante para caracterizar las poblaciones naturales de los hongos MA con vistas a estudios de diversidad, se recomienda complementar la caracterización de los hongos aislados mediante estudios tradicionales de morfología y ontogenia (Prosser, 2002).

Para determinar la diversidad de hongos MA se han de identificar las especies presentes en el suelo. La taxonomía de los hongos MA está basada en la morfología y ontogenia de las esporas, siendo imposible la identificación a nivel de especie por la morfología de las diferentes estructuras formadas durante la colonización radical. Otra característica es que la abundancia relativa de esporas en el suelo puede no ser un buen estimador de la dinámica y composición de la comunidad de hongos MA (Clapp *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1995; Merryweather & Fitter 1998). Se ha hecho necesaria una aproximación molecular para la caracterización de las especies de hongos MA que colonizan las raíces de las plantas para centrarse en aquellos hongos que presentan crecimiento y actividad (Helgason *et al.*, 1999; Clapp *et al.*, 2002). Para abordar este objetivo se han diseñado cebadores específicos para la amplificación de la subunidad pequeña del ADNr (Helgason *et al.*, 1998), que permite la amplificación de hongos MA que colonizan las raíces (Helgason *et al.*, 1998, 1999; Daniell *et al.*, 2001).

El uso de la subunidad 18s del ADNr ha proporcionado una poderosa herramienta para la caracterización de hongos MA, lo que ha mejorado el conocimiento acerca de su diversidad y filogenia (Helgason, *et al.*, 1999). Recientemente, se han desarrollado métodos basados en la separación de fragmentos amplificados con cebadores específicos para hongos MA de igual tamaño pero de diferente secuencia. Entre estos métodos se incluyen SSCP (Kjøller *et al.*, 2000) y DGGE (Kowalchuk, 2002; Öpik *et al.*, 2003). Una técnica más reciente, TTGE, ha comenzado a emplearse con resultados óptimos. Esta técnica se fundamenta en el mismo principio que el DGGE, con la ventaja de no tener que emplear un gradiente químico para la desnaturalización del ADN (Yoshino *et al.*, 1991). El principio de separación está basado en el comportamiento de las moléculas de ADN al desnaturalizarse. Al migrar por un gel de acrilamida, la cadena doble de ADN está sometida a unas condiciones físicas que provocan su desnaturalización. La composición de la secuencia es determinante para este proceso, siendo la temperatura de fusión ( $T_m$ ) específica de la secuencia. Cuando se alcanza la temperatura de fusión más baja de las regiones de un fragmento, se producen ramificaciones en el ADN modificando su configuración espacial y reduciendo la velocidad de migración en el gel de poliacrilamida. Esto permite la separación de fragmentos de ADN basándose en la temperatura de fusión propia de cada secuencia.

### **3.2. Materiales y Métodos**

#### **3.2.1. Producción de cultivos puros de hongos MA aislados de la parcela experimental**

De acuerdo con el protocolo 6.1, las esporas obtenidas de suelo de la parcela experimental, se inocularon sobre la raíz de las semillas pregerminadas de trébol. Concretamente se inoculó una spora de cada uno de los morfotipos diferentes extraídos. Tras 5 ó 6 meses de crecimiento, se obtuvieron inóculos puros correspondientes a cada uno de los morfotipos. Una vez comprobada la pureza de los inóculos, se procedió a transferir el suelo y la planta a macetas de mayor tamaño para la obtención de mayor cantidad de inóculo. Este inóculo se empleó en posteriores experimentos, tanto inoculando directamente de la maceta como extrayendo las esporas y esporocarpos. La identificación de los morfotipos se llevó a cabo siguiendo las técnicas descritas por Koske & Tessier (1993) y Morton (1991) (protocolo 6.2).

#### **3.2.2. Análisis molecular de los hongos MA aislados**

Para la identificación molecular de los diferentes morfotipos aislados, las esporas se extrajeron según se describe en el apartado 6.1 de Material y Métodos general. El ADN de la subunidad 18s del ADNr amplificó mediante la pareja de cebadores NS31 y AM1. Las bandas seleccionadas se eluyeron, clonaron y secuenciaron como se describe en los apartados correspondientes del punto 7 de Material y Métodos generales.

#### **3.2.3. Análisis filogenético de los aislados**

A partir de los datos obtenidos de la secuenciación de los productos de PCR, se realizaron los distintos análisis filogenéticos de las distintas especies utilizando el programa de alineamiento múltiple de secuencias CLUSTALW (versión 1.5) <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Con la ayuda del programa PHYLIP, disponible en: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, se calculó el porcentaje de sustitución nucleotídica entre las secuencias, usando la distancia 2-parámetro de Kimura (Kimura, 1980).

En el análisis filogenético de las secuencias de esta región se ha utilizado el método de distancia (Saitou & Nei, 1987), con el programa PHYLIP. Con el método de las distancias se realizó un bootstrap con 1000 réplicas, seguido de un análisis de neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) (opción NEIGHBOR).

El árbol filogenético obtenido mediante el método de distancias se visualizó con la ayuda del programa Tree View (Win16 v1.40).

### 3.2.4. Estudios de biodiversidad de hongos MA

Para el análisis de la diversidad de hongos MA se empleó el suelo recuperado del ensayo descrito en el capítulo de resultados 2.2. Se escogió este ensayo debido a que las plantas completaron su ciclo vital. La extracción de las esporas se realizó según se describe en el apartado 6.1 de Material y Métodos generales. Las esporas se agruparon según sus características morfológicas según el protocolo descrito en el punto 6.2 de Material y Métodos.

Una vez identificados los distintos tipos de esporas de hongos MA en el suelo objeto de estudio se procedió al estudio poblacional de los mismos, mediante la utilización de los siguientes parámetros:

Nº total de esporas

Densidad relativa:

$$D_i = n_i/N$$

“ $n_i$ ” es el número de esporas del tipo “ $i$ ” y “ $N$ ” es el número total de esporas.

Riqueza media de especies (S): Es el número total de especies encontradas en cada muestra objeto de estudio.

Índice de Diversidad de Shanon-Wiener (H’):

$$H = - \left( \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \cdot \ln \frac{n_i}{N} \right)$$

Este índice expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección (Magurran, 1988). Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de  $S$ , cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran, 1988).

Índice de dominancia de Berger-Parker (d): Es una simple medida intuitiva de la dominancia (Berger y Parker 1970), tiene la ventaja de ser fácilmente calculable. Expresa la abundancia proporcional de la especie más abundante.

$$d = N_{\max}/N$$

$N_{\max}$  representa el número de individuos de la especie más abundante.

### **3.2.5. Identificación de hongos MA que colonizan las raíces**

En el caso del trigo las semillas se plantaron e inocularon como se describe en los apartados correspondientes de Material y Métodos. Se plantó una semilla por maceta, con seis repeticiones para cada uno de los tratamientos microbianos (*A. brasilense* Sp245, GM 5005 y un control sin inocular (NI).

Para la determinación en plantas de maíz no se prepararon específicamente macetas sino que se empleó una alícuota de raíz del experimento 2.3, por lo que también se incluyó el tratamiento CRT1.

Para la identificación de los hongos que colonizan las raíces se procedió a la secuenciación de las diferentes bandas obtenidas en los geles de TTGE. Dicho protocolo viene recogido en los apartados correspondientes del punto 7 de Material y Métodos generales.

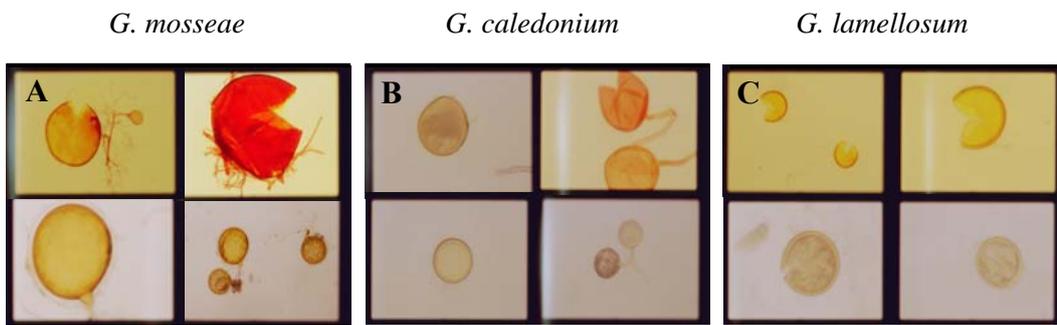
## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Aislamiento, identificación y filogenia de las especies presentes en el suelo objeto de estudio.**

En un principio se determinaron 12 morfotipos de esporas, las cuales se inocularon sobre trébol y sorgo (Figura 3.2). De estas 12 macetas se obtuvieron 7 cultivos puros. La identificación molecular de las esporas dio como resultado que 5 aislados correspondían a *G. mosseae*, uno a *G. caledonium* y otro a *G. lamellosum* (Figura 3.3).



**Figura 3.2:** (A) Aislamiento inicial de los morfotipos de hongos MA de la parcela experimental de la EEZ. (B) Cultivos puros de hongos MA.



**Figura 3.3:** Esporas de los diferentes hongos aislados de la parcela experimental. Fila superior Reactivo Metzler, inferior PVLG.

Las secuencias denominadas “Tipo” y “rep” (Figura 3.4C) corresponden a la secuenciación en sentidos 3’ y 5’, por lo que se observa que no existe casi ninguna diferencia en la secuencia, únicamente existe diferencia en la secuencia de *G. lamellosum* probablemente debido a un error de secuenciación en dos de las bases que componen la secuencia. La secuencia NCBI corresponde a la secuencia de los hongos de cada especie obtenida de la base de datos NCBI.

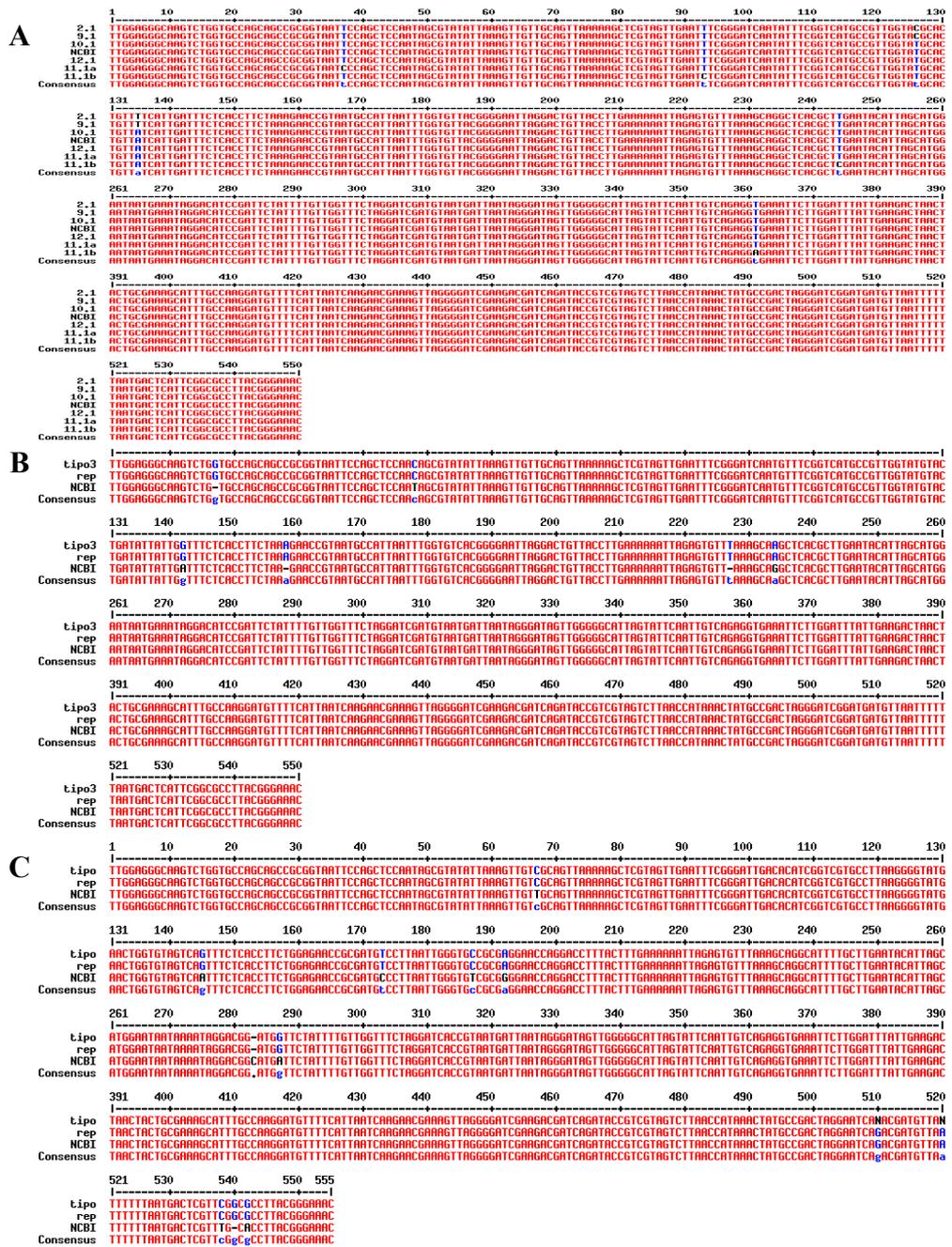


Figura 3.4: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los hongos micorrícicos aislados de la parcela experimental tras la amplificación de la subunidad pequeña del ADNr con los cebadores NS31 y AM1, descritos en la tabla X. En el alineamiento se ha incluido la secuencia de los hongos correspondientes obtenida de la base de datos NCBI. En color rojo se muestran los sitios idénticos de las secuencias y en color negro las distintas al nucleótido consenso.

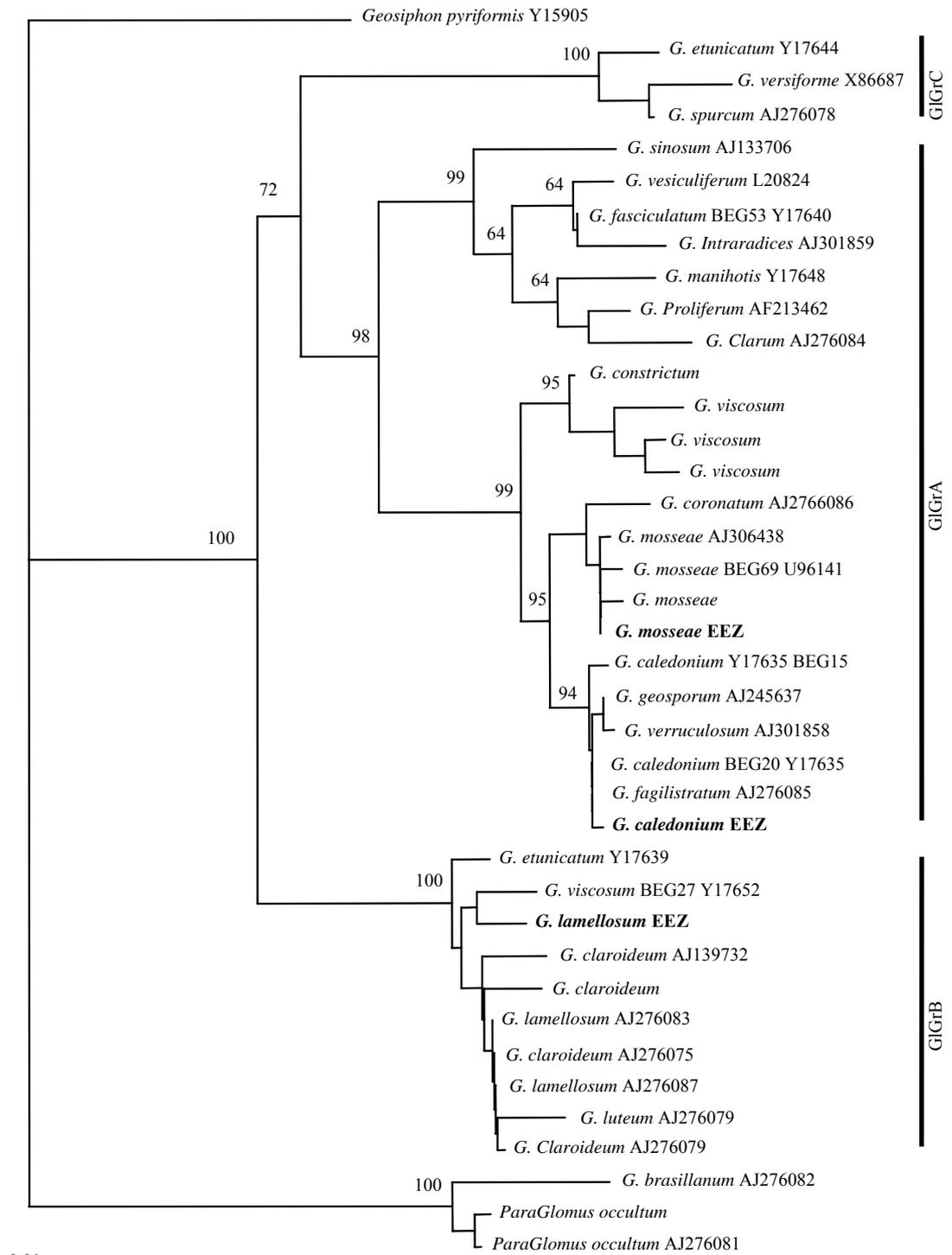
*Análisis filogenético de los aislados*

El análisis filogenético (Protocolo 8) de las secuencias obtenidas en este estudio y otras seleccionadas de la base de datos pertenecientes a hongos micorrícicos mostró que las nuevas secuencias de las distintas especies de los hongos aislados de la parcela experimental se agrupan con las secuencias de las mismas especies obtenidas en otros laboratorios (Figura 3.5). Como grupo externo de referencia (outgroup) se utilizó *Geosiphon pyriforme*, el ancestro más antiguo de los Glomerales (Gehrig *et al.*, 1996).

El número de acceso de las secuencias utilizadas se muestra en la siguiente Tabla 3.1.

Nº de acceso	Especie correspondiente	Nº de acceso	Especie correspondiente
Y15905	<i>G. pyriforme</i>	AJ306438	<i>G. mosseae</i>
AJ301862	<i>G. brasilianum</i>	AJ276086	<i>G. coronatum</i>
AJ133706	<i>G. sinuosum</i>	AJ276087	<i>G. coronatum</i>
Y17648	<i>G. manihotis</i>	Y17653	<i>G. caledonium</i> BEG 15
AF213462	<i>G. proliferum</i>	AJ505619	<i>G. clarum</i> BEG125
AJ276084	<i>G. clarum</i>	AJ276085	<i>G. fragilistratum</i>
AJ276084	<i>G. clarum</i>	AJ245637	<i>G. geosporum</i>
AJ505617	<i>G. intraradices</i> BEG 123	AJ301858	<i>G. verruculosum</i>
AJ536822	<i>G. intraradices</i> BEG121	AJ505813	<i>G. viscosum</i> EEZ-20
AJ505615	<i>G. intraradices</i> EEZ 1	AJ505620	<i>G. viscosum</i> BEG 126
X58725	<i>G. intraradices</i>	AJ505812	<i>G. viscosum</i> EEZ 34
AJ301859	<i>G. intraradices</i>	AJ506091	<i>G. claroideum</i>
Y17640	<i>G. fasciculatum</i> BEG 53	Y17652	<i>G. viscosum</i> BEG 27
AF231760	<i>G. fasciculatum</i>	Y17639	<i>G. etunicatum</i>
AJ505618	<i>G. mosseae</i> BEG 124	AJ276087	<i>G. lamellosum</i>
AJ505614	<i>G. mosseae</i> BEG 119	AJ276079	<i>G. claroideum</i>
AJ505616	<i>G. mosseae</i> BEG 122	AJ276075	<i>G. claroideum</i>
U96141	<i>G. mosseae</i> BEG 69	AJ276089	<i>G. luteum</i>

**Tabla 3.1:** N° de acceso en el EMBL de las secuencias de la SSU utilizadas en el análisis filogenético



**Figura 3.5:** Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 18S de los hongos aislados en la parcela experimental. El Out Group corresponde a *Geosiphon pyriformis* (Y15905). En negrita se indican los hongos aislados en la presente tesis doctoral.

### 3.3.2. Impacto de la inoculación de *Azospirillum* sobre la diversidad de hongos MA

Las esporas se separaron según los caracteres morfológicos que presentaban. Estas en un principio se agruparon en 8 grupos con características similares. Tras analizar la secuencia de la región V3 de la subunidad 16s (7 de Material y Métodos), se comprobó que no todos grupos los aislados eran diferentes. Tres de los tipos, clasificados morfológicamente como *G. mosseae*, *G. lamellosum* y *G. caledonium* sí correspondieron a las especies identificadas como tales, sin embargo, las secuencias de los 5 grupos restantes clasificados como *Glomus* sp. produjeron máxima homología con las secuencias de *G. mosseae* de la base de datos NCBI.

Con la identificación de las esporas presentes en el suelo, se calcularon los índices de diversidad de Shanon-Wiener, Berger-Parker y la densidad relativa de hongos MA para cada uno de los tratamientos en las dos plantas.

#### Suelo No Cultivado:

El suelo no cultivado presentó un bajo número de esporas de hongos MA. En este caso solamente las especies *G. mosseae* y *G. lamellosum* se detectaron en dicho suelo. La proporción de esporas pertenecientes a la especie *G. mosseae* fue tres veces superior a la de *G. lamellosum* (tabla 3.2).

<b>Suelo No Cultivado</b>	<b><i>G. mosseae</i></b>	<b><i>G. lamellosum</i></b>	<b>Índice Shanon-Wiener</b>
Nº esporas	21	7	
$D_i = n_i / N$ NC	0,75	0,25	0,5623

**Tabla 3.2:** Cantidad de esporas, densidad relativa ( $D_i$ ) e Índice Shanon-Wiener en 50g de suelo No Cultivado.

Tras la cosecha de las plantas de maíz, el número de esporas aisladas se incrementó hasta un 2170% en el caso de *G. mosseae* en el tratamiento CRT1. Las esporas de *G. caledonium*, las cuales no se detectaron en el suelo no cultivado, se detectaron en todos los tratamientos. En el suelo cultivado con trigo se encontró menor cantidad de esporas que en la rizosfera de maíz no detectándose *G. caledonium* en los tratamientos Control y GM 5005.

<b>MAÍZ</b>	<i>G. mosseae</i>	<i>G. lamellosum</i>	<i>G. caledonium</i>	<b>N° total esporas</b>
CONTROL	392	30	16	438
CRT1	477	45	18	540
Sp245 WT	448	38	18	504
GM 5005	393	35	15	443
Fertilizado	359	31	14	404

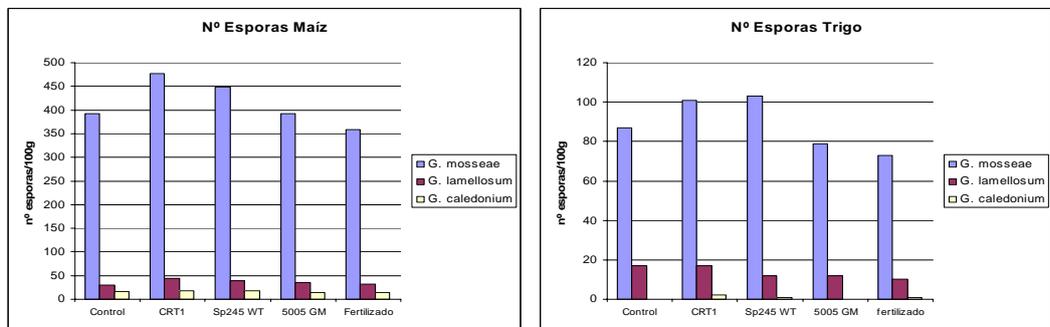
  

<b>TRIGO</b>	<i>G. mosseae</i>	<i>G. lamellosum</i>	<i>G. caledonium</i>	<b>N° total esporas</b>
CONTROL	87	17	0	104
CRT1	101	17	2	120
Sp245 WT	103	12	1	116
GM 5005	79	12	0	91
Nitrato	73	10	1	84

**Tabla 3.3:** Cantidad de esporas presentes en el suelo de cada uno de los tratamientos de maíz y trigo en 50g de suelo.

<b>Tratamiento</b>	<b>MAÍZ</b>		<b>TRIGO</b>	
	<b>Indice Wiener</b>	<b>Shanon- e<sup>H</sup></b>	<b>Indice Wiener</b>	<b>Shanon- e<sup>H</sup></b>
CONTROL	0,4038	1,49755	0,4453	1,56106
CRT1	0,4300	1,53730	0,4901	1,63260
Sp245 WT	0,4186	1,51983	0,3812	1,46405
GM 5005	0,4214	1,52411	0,3899	1,47686
Fertilizado	0,4184	1,51962	0,4280	1,53431

**Tabla 3.4:** Índices de Shanon-Wiener para hongos MA de plantas de trigo y maíz inoculadas con *Azospirillum*.



**Figura 3.6:** N° de esporas aisladas de rizosfera de maíz y trigo inoculadas con *Azospirillum*.

Tratamiento	Índice Berger-Parker	
	MAÍZ	TRIGO
CONTROL	0,8949	0,8365
CRT1	0,8833	0,8416
Sp245 WT	0,8888	0,8879
GM 5005	0,8871	0,8681
Fertilizado	0,8886	0,8690

**Tabla 3.5:** Índice de Berger-Parker para la especie mas abundante.

El índice de Berger-Parker (d) para todos los tratamientos y para las dos plantas indicó que la especie predominante es *G. mosseae*. Este valor resultó muy alto, lo que indica que la gran dominancia de esta especie (Tabla 3.5).

Para analizar mas fácilmente los valores del índice de Shannon-Wiener, los valores se transformaron (tabla 3.4). Los índices de equidad en plantas de maíz resultaron similares para todos los tratamientos. Sin embargo en trigo se observaron modificaciones en la equidad del sistema. Valores mas altos que el control (CRT1) indican una variación en alguna de las especies representadas que no se vio acompañada proporcionalmente por el resto.

La cantidad de esporas extraídas del suelo de cada planta se vio afectada por la inoculación de las diferentes cepas de *Azospirillum*.

En todos los tratamientos de las plantas de maíz se detectaron esporas de los tres hongos en el suelo rizosférico. En los tratamientos control y GM 5005 de plantas de trigo, no se identificó *G. caledonium*, mientras que en el resto de los tratamientos se detectaron de 1 a 2 esporas de dicho hongo. La inoculación de las cepas CRT1 y WT produjo un incremento en la esporulación de *G. mosseae* en ambas plantas, mientras que las otras especies de hongos no se vieron afectadas por ninguno de los otros tratamientos.

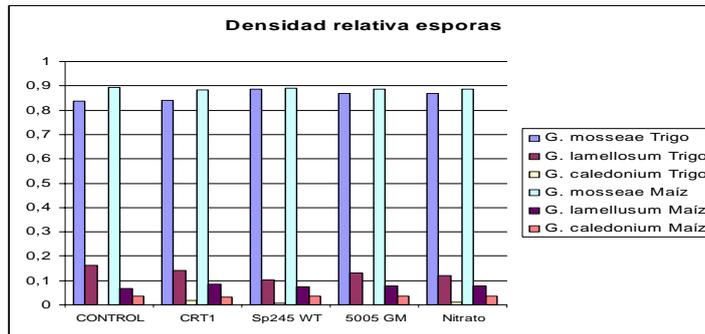
*G. mosseae* es el hongo mas abundante en la rizosfera de ambas plantas, constituyendo entre el 83 y 89% de las esporas aisladas de ambas plantas. *G. lamellosum* también se encontró presente en todos los tratamientos y en ambas plantas en una proporción que osciló entre el 7 y el 10% de las esporas aisladas. *G. caledonium* no fue identificado entre las esporas extraídas de los tratamientos control y GM de trigo.

El crecimiento de una planta en el suelo incrementó notablemente el número de esporas. Así, el trigo incrementó el número entre el 300% y el 428% y el maíz entre el 1442% y el 1928% correspondiendo el valor mínimo al tratamiento fertilizado y el máximo a CRT1 en ambas plantas.

La producción de esporas en rizosfera de maíz fue superior en 4 veces a la producción del trigo.

En ambas plantas la composición de la comunidad micorrícica determinada por la densidad relativa de esporas fue similar. La densidad relativa de esporas se mantuvo constante para todos los tratamientos y en ambas plantas (Figura 3.6). Entre ambas plantas se observó una diferencia apreciable en cuanto al número

de esporas extraídas según la planta hospedadora. El número de esporas fue claramente superior en maíz que en trigo pero el porcentaje de cada especie se mantuvo prácticamente constante.

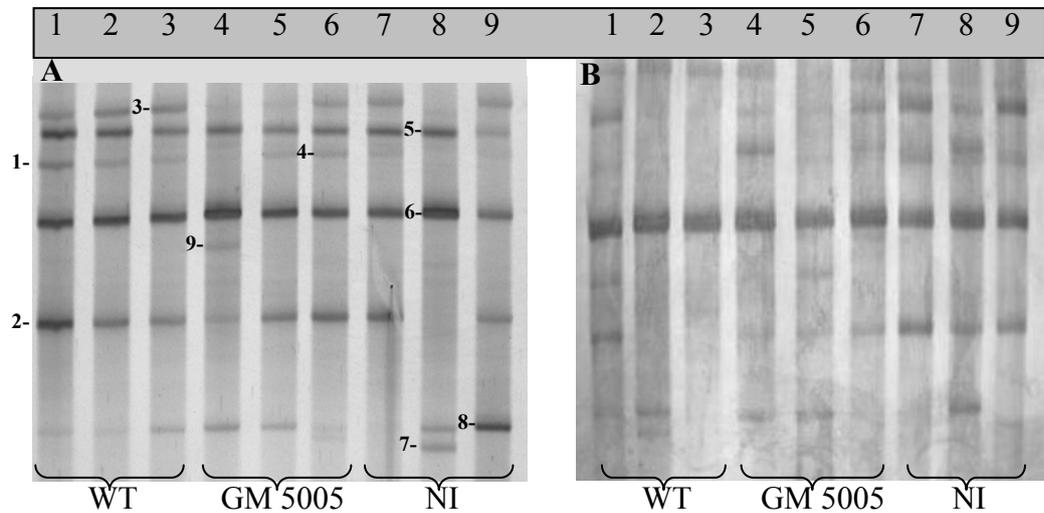


**Figura 3.6:** Densidad relativa de esporas de los hongos MA en plantas de maíz y trigo inoculadas con *Azospirillum*.

### 3.3.3. Identificación de hongos MA que colonizan raíces

Una vez realizado el estudio de diversidad de hongos MA en la rizosfera de plantas de trigo y de maíz, se procedió a realizar un estudio de los hongos que colonizan las raíces por medio de técnicas moleculares.

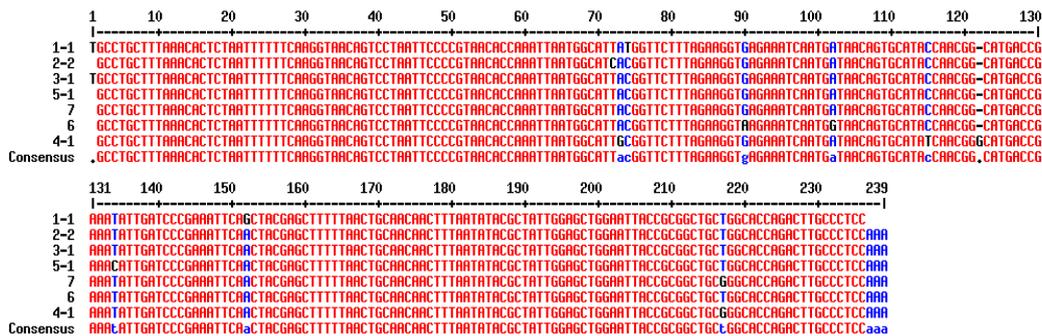
Para realizar dicho estudio en trigo se diseñó un experimento procedió a emplear suelo natural



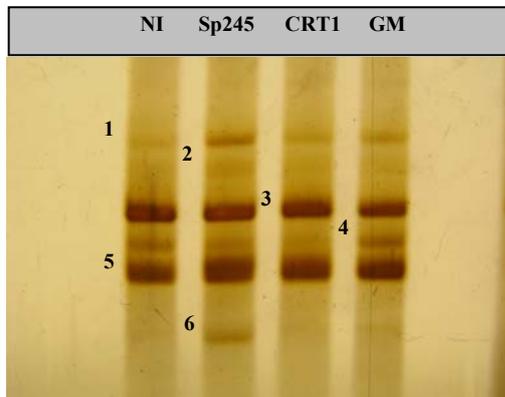
**Figura 3.7:** Gel TTGE de productos PCR nidada en plantas de trigo. (A) Calle 1-3 inoculado WT, 4-6 inoculado GM, 7-9 No Inoculado (NI). La primera calle de cada grupo corresponde a cosecha a 4 semanas, la segunda 6 semanas y la última a 8 semanas. Las bandas numeradas se secuenciaron. El gel B se cargó con productos de PCR obtenidos de otra repetición de plantas.

Las bandas mas representativas del gel TTGE de acrilamida-bisacrilamida (Figura 3.7A) se reamplificaron por PCR para su posterior secuenciación.

Al analizar la secuencia de las bandas seleccionadas del gel, se aprecia que todas y cada una de ellas son diferentes entre si en al menos una base. Esta leve diferencia provoca que la velocidad de migración de las bandas sea diferente para cada una de ellas. La temperatura de fusión varía según la secuencia nucleotídica por lo que los fragmentos amplificados se separan diferencialmente. Mediante la herramienta “Blastn” de la base de datos NCBI, se comprobó la máxima homología de dichas secuencias. Los resultados indicaron que la mayoría de las bandas obtenidas (nº 1-8) eran polimorfismos del hongo *G. mosseae* y sólo una de las bandas (nº 9) era identificada para *G. caledonium*.



**Figura 3.8:** Alineamiento de las secuencias correspondientes las bandas eluidas del gel TTGE de trigo e identificadas como *G. mosseae*.



**Figura 3.9:** Gel TTGE de productos PCR nidada de raíces de maíz inoculadas con *Azospirillum*. Las bandas señaladas se eluyeron para su secuenciación.

Respecto a la identificación de hongos MA que colonizaron las raíces de maíz, los productos de la PCR nidada se cargaron en otro gel de TTGE de las mismas características que para trigo. Resultados idénticos al presentado en la Figura 3.9

se obtuvieron al correr el producto de PCR obtenido del ADN de las plantas correspondientes a las repeticiones del ensayo.

Las bandas obtenidas corresponden a las secuencias amplificadas de los hongos que colonizan raíces de maíz inoculadas con las diferentes cepas de *Azospirillum*. Las bandas amplificadas corresponden a fragmentos amplificadas con los cebadores seleccionados para hongos MA. Cada banda corresponde a un fragmento cuya secuencia de bases difiere con respecto a otra. Las bandas una vez reamplificadas y secuenciadas indicaron que las raíces se encontraban micorrizadas con diferentes especies de hongos MA. Así, mientras las bandas 1, 2, 3, 5, y 6 corresponden a *G. mosseae*, la banda n° 4 presentó máxima homología con *G. lamellosum*. A diferencia del gel de trigo, en este caso, ninguna de las bandas dio homología con *G. caledonium*. En todos los tratamientos se observaron las mismas bandas, indicando que la colonización fue realizada por las mismas especies.

### 3.4. *Discusión*

La caracterización molecular de los hongos MA ha sido una tarea complicada en el pasado debido al elevado grado de variación detectada entre las copias de ADN ribosómico presentes en una única espora, lo que cuestionaba la validez de estos métodos para la investigación filogenética de los Glomerales (Hijri *et al.*, 1999; Sanders *et al.*, 1999). Sin embargo, trabajos de investigación recientes indican que el análisis de las secuencias de la subunidad pequeña del ADNr es una herramienta indicada para estudiar relaciones filogenéticas entre los hongos micorrícicos. Las diferencias esperadas en las secuencias podrían estar más vinculadas a entidades taxonómicas distintas que las encontradas en las secuencias multialélicas de los ITS (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott & Schüßler, 2001). Los genes ribosómicos se encuentran repetidos en tandem a lo largo del genoma y en la mayoría de los organismos no se han observado grandes variaciones entre las distintas copias, aceptándose de forma generalizada que las variaciones en la secuencia de bases de los genes ribosómicos son reflejo de las relaciones filogenéticas entre grupos, característica que ha convertido a estos genes en una fuente de información filogenética. La subunidad ribosómica pequeña presenta una tasa de evolución menor, lo que condiciona que el gen esté más conservado. Por esta razón, se eligió el análisis de las secuencias del ARNr del 18S para caracterizar genéticamente los diferentes morfotipos aislados. Se ha preferido utilizar *Geosiphon pyriforme* como grupo externo de referencia para la elaboración del árbol filogenético, en vez de *Endogone pisiformis*, ya que cada vez hay más evidencias de que se trata del ancestro más próximo de los hongos MA (Gehrig *et al.*, 1996).

El uso de un cebador específico de los Glomerales, el AM1, ha evitado la amplificación de ADN contaminante de otros organismos (Helgason *et al.*, 1998).

Los hongos *G. mosseae*, *G. caledonium* y *G. lamellosum* aislados de la parcela experimental, así como los hongos procedentes de la colección de la EEZ, aparecieron ubicados en el árbol filogenético junto con aislados de la misma especie procedente de otros laboratorios. Esto corrobora su identificación morfológica y refuerza la idea de que organismos de la misma especie (morfotipo) presentan relaciones filogenéticas muy estrechas (Schwarzott *et al.*, 2001).

La única excepción ha sido que la secuencia de *G. lamellosum* EEZ se localizó en la misma rama aunque a una distancia algo alejada del *G. lamellosum* de referencia (AJ276087) disponible en la base de datos. En este sentido hay que referir que en estudios anteriores de filogenia (Schüßler *et al.*, 2001) también observaron que diferentes aislados de *G. clarum* se situaban en diferentes ramas cuando se analizaban las secuencias de la subunidad pequeña del ARNr amplificadas con los cebadores NS1 y NS2. Las razones de esta divergencia no se conocen. Las dificultades para diferenciar *G. clarum* desde un punto de vista morfológico de otras especies de Glomerales podría ser la base de estas divergencias. Sin duda, estudios adicionales ayudarán a elucidar porqué diferentes aislados de algunas especies del género *Glomus* difieren desde un punto de vista filogenético. Asimismo, el número creciente de secuencias disponibles en las bases de datos debido al crecimiento exponencial de los estudios de caracterización molecular contribuirá a una mejor comprensión de las relaciones filogenéticas entre los hongos formadores de MA.

En la parcela experimental se han encontrado solo tres morfotipos diferentes de hongos MA. En general podríamos decir que la diversidad de especies de hongos micorrícicos encontrada en la parcela experimental se puede considerar entre media y baja. Curiosamente no se han aislado otras especies de hongos que se habían detectado 5 años antes en el mismo suelo (tesis de María del Mar Vázquez) como son *G. infrequens* o *G. intrarradices*. La no detección de *G. intrarradices* no significa que no se encuentre en la parcela ya que este microorganismo se ha detectado con anterioridad y está presente en la mayoría de los ecosistemas de la cuenca mediterránea (Calvente *et al.*, 2004). La detección de *G. infrequens* resulta mas problemática que la de *G. intrarradices*. En un cultivo puro de *G. infrequens* de 1999 (que contenía un bajo número de propágulos) dejó de detectarse el hongo al cabo de un año, por lo que se deduce la gran dificultad de aislamiento y producción de determinados hongos. Hay que tener en cuenta que en la parcela experimental se ha mantenido en barbecho durante largo tiempo antes de la toma de muestras, por lo que es normal que tanto la diversidad como el número de propágulos de las especies presentes no sea elevado. El número de propágulos detectados en la rizosfera de trigo y maíz aumenta considerablemente respecto al suelo no cultivado aunque el aumento en número de especies no sea tan acusado.

Tanto la cantidad como la diversidad de hongos varían enormemente según el ecosistema que se estudie. En otros agrosistemas se han encontrado cifras muy superiores de especies de hongos micorrícicos. Por ejemplo, en praderas del continente americano se han encontrado hasta 16 especies distintas de hongos

micorrícicos (Eom *et al.*, 2000). Esas cifras, en cualquier caso, distan mucho de las encontradas en agrosistemas mediterráneos, en los que normalmente no se encuentran representadas más de 5-6 especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares, la mayoría de ellas pertenecientes al género *Glomus* (Atkinson *et al.*, 2002; Ferrol *et al.*, 2003). La diversidad de especies encontrada en la parcela experimental coincide por lo tanto, con la descrita en sistemas próximos aunque no similares. Hay que tener en cuenta, en cualquier caso, que la metodología empleada supone una estimación a la baja de la diversidad real existente en el suelo, ya que la caracterización morfológica y molecular se ha llevado a cabo solamente sobre las especies que se han podido multiplicar mediante la utilización de plantas trampa y que, en esas condiciones, han sido capaces de esporular. Es razonable pensar que hongos con menor capacidad de adaptación a situaciones variables, o que no esporulan en esas condiciones, como podría ser el caso de algunas especies de *Gigaspora* o *Scutellospora*, sean difícilmente detectables en nuestras condiciones (Morton *et al.*, 1995; Clapp *et al.*, 2002).

La identificación de especies de hongos MA mediante el uso de técnicas electroforéticas se ha comenzado a realizar recientemente (Öpik *et al.*, 2003; Cornejo *et al.*, 2004). En los trabajos mencionados, se describe la dificultad para identificar a nivel de especie los hongos que colonizan raíces con una sola pareja de cebadores (GC NS31-AM1. El diseño de un segundo cebador (Inglo2) empleado para la reamplificación del fragmento ha permitido la identificación a nivel de especie mediante TTGE (Cornejo *et al.*, 2004).

Los resultados muestran hasta ocho bandas correspondientes a *G. mosseae* en la amplificación de raíces de trigo. El análisis de las secuencias de las bandas indicó que todas y cada una de ellas diferían entre sí en al menos una base. Esto contrasta con lo observado por Cornejo *et al.*, (2004) que obtuvieron una sola banda para esta especie. Sin embargo, en el caso de *G. viscosum* se observaron hasta 4 bandas. La aparición de múltiples bandas correspondientes a una misma especie, sugiere como se ha descrito por Sanders *et al.*, (1995) una gran variabilidad genética entre copias de genes del ARNr de especies de hongos MA. La evolución de los hongos MA ha producido una enorme variabilidad genética dentro de las mismas especies (Hijri y Sanders, 2001) en cuyas esporas pueden coexistir múltiples núcleos genéticamente diferentes (Trouvelot *et al.*, 1999).

El hecho de no detectar una banda correspondiente a *G. lamellosum* en trigo y de *G. caledonium* en maíz, no implica que estos no se encuentren colonizando la raíz. De hecho, es lógico pensar que sí colonizan estas plantas y que la bacteria inoculada no afecta a su capacidad de colonización ya que estas especies (aunque en menor proporción que *G. mosseae*) se han multiplicado en la rizosfera de estas plantas en el experimento 2.2 de esta tesis (tabla 3.4).

Aunque la sensibilidad de la técnica ha sido demostrada, es posible que la colonización de *G. mosseae* sea mucho mayor que la de *G. lamellosum* y *G. caledonium*, enmascarando la amplificación de los otros hongos. En la amplificación de ADN obtenido a partir de mezclas de esporas, compuestas por diferente número de esporas de dos hongos MA, se ha observado un

enmascaramiento de la amplificación de la especie minoritaria (Cornejo *et al.*, 2004). Esto, junto con la aleatoriedad de la colonización intraradical y la capacidad colonizadora de las diferentes especies, puede explicar que no se detectaran los hongos presentes en el suelo.

## **4. Impacto de la inoculación de *Azospirillum* WT y GM sobre distintas facetas del ciclo de vida de hongos MA**

### **4.1. Efectos de la inoculación de *Azospirillum* sobre la germinación de esporas de hongos MA *in vitro***

#### **4.1.1. Introducción**

Como es bien conocido, la secreción de compuestos procedentes de la planta o del metabolismo de microorganismos puede tener un importante efecto sobre el ciclo vital de otros componentes microbianos de la rizosfera (Bowen & Rovira, 1999). Este hecho tiene un especial significado tanto para la formación de la MA como en la interacción de *Azospirillum* y hongos MA.

Así en el establecimiento de la asociación simbiótica entre plantas y los hongos MA, y en el entramado de intercambio de señales entre los dos componentes de la simbiosis (Gadkar *et al.*, 2001, Vierheilig & Piche 2002), juegan un papel importante los exudados radicales. En efecto, los exudados radicales se encuentran entre los factores físicos y químicos que afectan al ciclo vital de los hongos, en especial la germinación de esporas y la elongación del micelio. La composición de estos es compleja (Bowen & Rovira, 1999). Entre los compuestos presentes se encuentran azúcares (Van Bastelaere, 1999) o flavonoides (Cerviño *et al.*, 2005). Estos compuestos son capaces de modificar el comportamiento de los microorganismos que habitan en la rizosfera, pudiendo alterar la síntesis de otros compuestos. Se ha descrito que la concentración de AIA afecta significativamente al micelio de los hongos MA (Gryndler *et al.*, 1998). Es por ello, que la co-inoculación de *Azospirillum*, productor de dicha hormona, puede afectar la germinación de esporas de hongos MA y/o el desarrollo posterior del micelio.

Dado que la capacidad colonizadora de los hongos MA se sustenta en el desarrollo de sus propágulos durante los estadios de pre-colonización (Figura 3, Introducción) es importante estudiar el efecto que tiene la inoculación sobre esta fase de los hongos MA.

De acuerdo con lo que antecede, los objetivos de este sub-capítulo son investigar el impacto de la inoculación de *Azospirillum*, los exudados radicales y/o el triptófano (precursor del AIA) sobre el desarrollo de propágulos de los hongos MA.

### 4.1.2. Material y Métodos

Los experimentos que constituyen el presente sub-capítulo se basan en ensayos de germinación *in vitro* (placa de Petri) de esporas de hongos MA.

Para la realización de este experimento se seleccionó *G. mosseae*, aislado del suelo en estudio como hongo modelo.

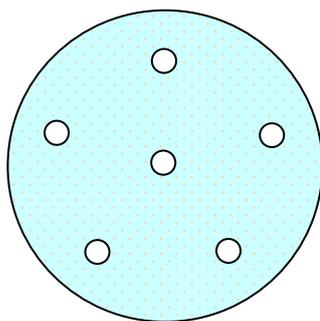
Las cepas bacterianas seleccionadas para este ensayo fueron la bacteria GM pFAJ5005 y su cepa WT Sp245, así como un control No Inoculado.

El medio de crecimiento seleccionado fue AAM (Carr & Hinkley, 1985) suplementado con 10% de exudados radicales y en su caso, triptófano a una concentración de 100µg/ml. Se utilizaron placas de Petri de 90mm Ø, sobre las que se depositaba el medio de cultivo a razón de 20 ml/placa.

La composición del medio AAM viene recogida en el apartado 5.6 de Material y Métodos.

Para seleccionar la concentración adecuada de los cultivos de *Azospirillum* para la inoculación de las placas, se ensayaron previamente varias concentraciones de los cultivos. Así, una vez obtenidos los inoculantes bacterianos ( $D.O_{600} = 1$ ) se hicieron diluciones seriadas de los mismos en agua destilada estéril y se utilizaron las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , sobre medio AAM. Se empleó como inóculo 100µl de suspensión que se extendieron homogéneamente por la placa con un asa de vidrio. Se observó que la concentración mas adecuada para este ensayo era la dilución  $10^{-4}$  ya que a mayores concentraciones se inhibía drásticamente la germinación de las esporas y cubría casi por completo toda la superficie de las placas.

Para los ensayos propiamente dichos, se prepararon 5 repeticiones de cada tratamiento, con 6 esporas por placa repartidas sobre los vértices de un pentágono imaginario y una en el centro.

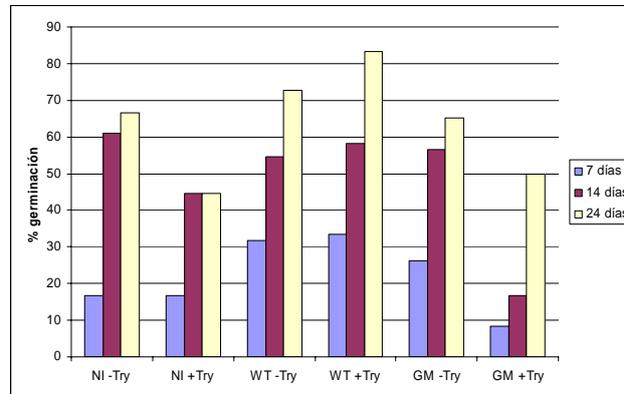


**Figura 4.1:** Disposición de las esporas en placa de medio AAM inoculado con *Azospirillum*

La cuantificación de la germinación de las esporas se realizó cada 7 días, a los 7, 14 y 24 días, cuando se observó que la germinación había concluido.

### 4.1.3 Resultados

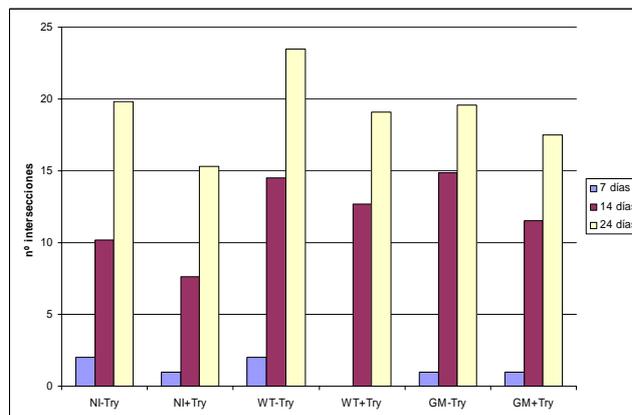
La Fig. 4.2., muestra los efectos de la inoculación de *Azospirillum* y de triptófano (Try) sobre la germinación de esporas.



**Figura 4.2:** Efecto de la inoculación de *Azospirillum* WT (Sp245) y GM 5005 sobre la evolución de la germinación de esporas de *G. mosseae* en presencia o no de triptófano.

La inoculación de *Azospirillum*, tanto WT como GM no afectó a la germinación de *G. mosseae* en ausencia de Try. Sin embargo, la cepa WT produjo un incremento de la germinación en medio suplementado con Try.

La Fig. 4.3 recoge los datos del ensayo que evalúa el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre la longitud del micelio de las esporas de *G. mosseae* en presencia o no de triptófano



**Figura 4.3:** Efecto de la inoculación de *A. brasilense* WT (Sp245) y GM (5005) sobre la longitud del micelio de las esporas de *G. mosseae* a diferentes tiempos en presencia o no de triptófano.

La inoculación de la cepa WT estimuló el desarrollo del micelio formado a partir de esporas de *G. mosseae*, tanto en ausencia como en presencia de Try. La cepa GM sólo incrementó el desarrollo de micelio en presencia de Try.

#### 4.1.4 Discusión

Es evidente que la germinación de las esporas de hongos MA se afectan por la presencia de Try y la co-inoculación con *Azospirillum*, como se ha descrito para otras bacterias (Azcón- Aguilar, *et al.*, 1986; Mayo *et al.*, 1986) probablemente a causa de la producción de determinadas sustancias estimuladoras (Hrselová & Gryndler 2000). Entre estas sustancias se encuentran las fitohormonas (Gryndler *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que *Azospirillum* transforma el Try en AIA, es lógico pensar que los efectos observados son debidos a la presencia de esta fitohormona.

Gryndler *et al.*, (1998) han descrito el efecto negativo de concentraciones elevadas de AIA sobre el desarrollo del micelio, teniendo en cuenta que la cepa GM es sobreproductora de AIA, se puede explicar que haya presentado un menor efecto que el ejercido por la cepa WT sobre *G. mosseae*. Aunque, como se vio en el Capítulo 1, la diferencia en la producción de AIA a partir de Try entre la cepa GM y WT no es muy elevada, los efectos positivos y negativos de las concentraciones de esta hormona se mueven en unos rangos muy ajustados. Así, una concentración de 0.3 $\mu$ M produce un efecto estimulador mientras que si aumenta hasta 30 $\mu$ M, se observa una inhibición total del crecimiento del hongo intrarradical.

Es posible que los efectos no positivos se deban a la concentración de AIA sintetizada por la cepa GM.

## **4.2. Efectos de la co-inoculación de *Azospirillum* y *G. mosseae* sobre el desarrollo y función de la MA en maíz.**

### **4.2.1 Introducción**

Dado que la inoculación de *Azospirillum* estimuló, en ciertos casos la germinación de esporas y el desarrollo del micelio en *G. mosseae*, estadios propios de la llamada fase de pre-colonización MA, es lógico suponer que dichos efectos trasciendan a fases posteriores del proceso de formación de la MA. Igualmente las evidencias de que *Azospirillum* pueda actuar como MHB (Pacovsky, 1989b; Bohwmik & Singh, 2004) aconseja comprobar dichos efectos en las condiciones del presente estudio. Con este objetivo se diseñó un experimento “ad hoc”, que se describe a continuación. En este experimento se pretende también investigar si los efectos sobre la formación de la MA repercuten en una mejora en el crecimiento de las plantas

### **4.2.2 Material y Métodos**

#### **Diseño experimental.**

Este ensayo se realizó con plantas de maíz.

El experimento se diseñó en macetas que contenían 1,5kg de suelo, cultivándose una planta por maceta. Se utilizó un inóculo bruto consistente en suelo rizosférico y fragmentos de raíces micorrizadas que contenía propágulos de *G. mosseae*. La inoculación de *Azospirillum* se realizó según se describe en el apartado 4.1 de Material y Métodos. Las cepas inoculadas fueron las cepas silvestres Sp245 y CRT1 y la GM5005, incluyéndose también un control no inoculado.

Se dispusieron 4 repeticiones para cada planta y tratamiento de inoculación.

#### **Extracción y cuantificación del micelio externo**

El micelio extrarradical se extrajo de tres repeticiones de 2 gramos de suelo rizosférico usando una modificación del método propuesto por Jakobsen *et al.* (1992).

A las muestras se les agregaron 40ml de agua. Se agitó en vortex durante 1 min, y se dejó reposar durante otro minuto. Se tomó una alícuota de 2 ml del centro del tubo, la cual se filtró en un tamiz de 50  $\mu$ m de luz de malla. Se lavó suavemente y al volumen recogido se le añadieron 5ml de azul tripán en ácido

láctico al 0.05%. Este volumen se filtró en un sistema de filtración múltiple a vacío con un filtro de nitrocelulosa cuadrículado (Whatman, 25 mm diámetro y 0.45µm de poro).

Los filtros se montaron sobre portaobjetos y se observaron al microscopio a 100 aumentos equipado con una retícula de 10 x 10 líneas en el ocular. La retícula se posicionó dentro de varias de las áreas cuadrangulares del filtro y se contaron las intersecciones de las líneas con el micelio. La longitud del micelio se determinó a partir de los datos obtenidos y aplicando la ecuación de Newman (1966).

$$R = \left( \frac{\pi AN}{2H} \right) \times Fd \times Fps$$

Donde  $R$  es la longitud de las hifas,  $A$  es el área de medición en el filtro ( $m^2$ ),  $N$  es el número de intersecciones,  $H$  es la longitud total de la retícula utilizada,  $Fd$  es el factor de dilución del suelo (20) y  $Fps$  es el factor de humedad del suelo.

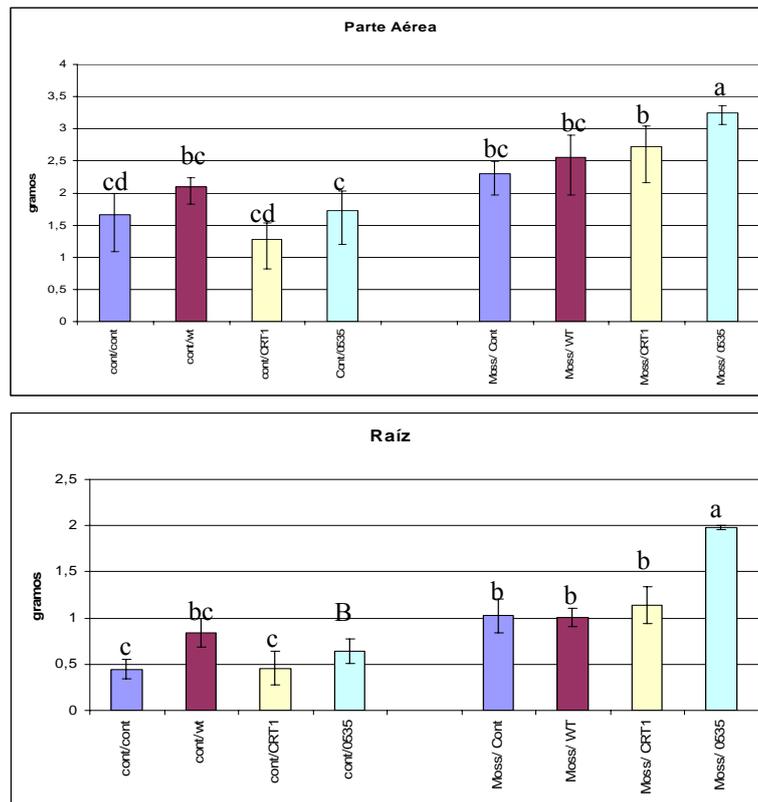
### 4.2.3 Resultados

La Fig. 4.4 recoge los datos de biomasa indeterminados tras la cosecha de las plantas de maíz.

Los resultados muestran que la inoculación de *G. mosseae* incrementó la biomasa de las plantas. La inoculación de *Azospirillum* en plantas no micorrizadas no produjo cambios en la producción de biomasa. Sin embargo, la inoculación conjunta del hongo MA y la cepa GM 5005 incrementó la biomasa de raíz y parte aérea.

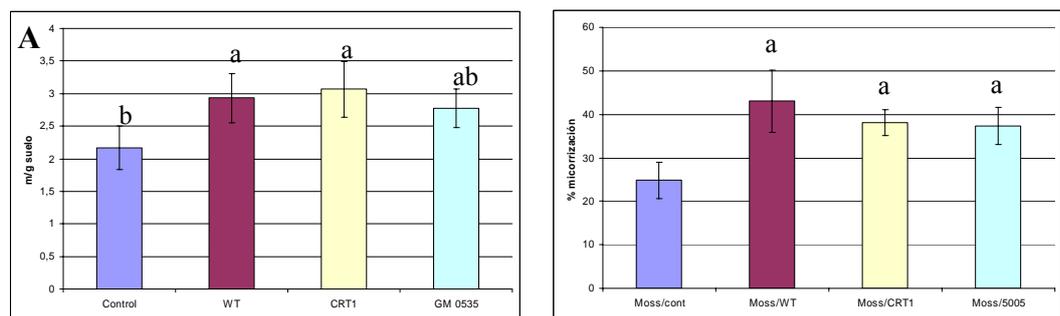
Como se puede observar en la figura 4.4, queda patente que la inoculación con *G. mosseae*, beneficia el crecimiento de las plantas, aunque los efectos beneficiosos son significativos solamente en el caso de plantas co-inoculadas con la cepa GM de esta bacteria.

La Figura 4.5 recoge respectivamente los datos de micorrización (colonización intraradical) y desarrollo de micelio externo producidos en plantas de maíz inoculadas con *G. mosseae* y *Azospirillum*.



**Figura 4.4:** Biomasa de plantas de maíz (peso seco expresado en g/planta) inoculadas con *G. mosseae* y *A. brasilense* WT Sp245 y GM5005 y *A. lifoferum* CRT1

Es obvio que la inoculación de *Azospirillum* estimuló la formación de la micorriza, tanto en su desarrollo intra- como extra-radical. Como se puede comprobar en la Fig. 4.5 (B), la respuesta de las plantas a la micorrización fue similar entre los tratamientos inoculados con *Azospirillum*. Particularmente, la cepa WT Sp245 incrementó hasta un 70% el grado de micorrización.



**Figura 4.5:** (A) Longitud de micelio externo y (B) Micorrización de plantas de maíz inoculadas con *G. mosseae* y *A. brasilense* WT Sp245 y GM5005 y *A. lifoferum* CRT1

#### 4.2.4 Discusión

Teniendo en cuenta que el objetivo general del proyecto ECO-SAFE era investigar la posible existencia de algún efecto negativo de la aplicación inoculantes de *Azospirillum* sobre la formación y efectos de la micorriza, se puede concluir que ninguno de los inoculantes interfirió de manera negativa ni la micorrización ni el desarrollo de las plantas. Como se discutió en el Capítulo 2, el efecto positivo de *Azospirillum* sobre el crecimiento vegetal suele deberse al hecho de ser estas bacterias productoras de AIA (Beyeler et al., 1997). Además, se ha descrito que la inoculación conjunta de *G. deserticola* y *A. brasilense* con incrementó la biomasa de maíz en comparación con el control no inoculado o inoculados por separado (Vázquez et al., 2000). Estos resultados parecen corroborar la existencia de una compatibilidad funcional entre microorganismos saprófitos y simbióticos (Azcón et al., 1991). Esto queda de manifiesto en los resultados de la interacción observados entre *G. mosseae* y *Azospirillum* en las plantas de maíz.

## **5. Estudio de la interacción de *Azospirillum* WT y GM con hongos MA mediante el uso de proteínas fluorescentes**

### **5.1 Introducción**

Como se ha descrito anteriormente, las bacterias tipo PGPR se asocian a la superficie de las raíces en donde desarrollan actividades beneficiosas para el crecimiento, nutrición y/o la salud de la planta. Un aspecto muy importante para la competitividad de las PGPR es su capacidad para colonizar la rizosfera y mantener un equilibrio estable en la superficie radical (Lugtemberg & Dekkers, 1999). Se ha demostrado que una baja colonización puede disminuir funciones tan importantes como la de biocontrol (Schippers *et al.*, 1987) o su actividad promotora del crecimiento (Bashan, 1998).

Las PGPR interactúan en el suelo no solo con las plantas sino también con una gran variedad de microorganismos, entre ellos los hongos MA. En este sentido, se han descrito interacciones sinérgicas y antagónicas de los hongos MA con las PGPR (Barea *et al.*, 2005). Durante los últimos años se han descrito numerosas especies de bacterias asociadas a la micorrizosfera de diferentes plantas (Andrade *et al.*, 1998; Founoune *et al.*, 2002). Se ha sugerido la importancia de contacto físico de ambos microorganismos, lo cual se ha descrito para algunas cepas bacterianas tanto WT como GM (Bianciotto *et al.*, 1996; Vande Broek *et al.*, 1998; Toljander *et al.*, 2005).

Se sabe que los hongos AM son capaces de influenciar la composición de las comunidades bacterianas asociadas a la micorrizosfera. Para explicar dicho efecto se han propuesto multitud de mecanismos, entre otros el aporte de compuestos por parte del micelio extrarradical (Andrade *et al.*, 1997), cambios en la estructura del suelo (Tisdall & Oades, 1979), competición por nutrientes (Ravnskov *et al.*, 1999), o cambios en la composición de los exudados radicales (Söderberg *et al.*, 2002). De la misma forma que los hongos MA afectan a la comunidad bacteriana, se ha sugerido que ciertas bacterias en la micorrizosfera, afectan al crecimiento y establecimiento de los hongos MA. Determinadas bacterias estimulan procesos como la germinación de esporas (Xavier & Germida, 2003), o la colonización radical por hongos MA (Toro *et al.*, 1997; Budi *et al.*, 1999). La importancia de las asociaciones bacterianas a la micorriza se ha puesto de manifiesto tras la descripción de las denominadas MHB por Garbaye, las cuales mejoran tanto la formación y actividad de la micorriza como el crecimiento vegetal (Garbaye, 1994). Aunque el significado de las interacciones entre bacterias y hongos MA está bien establecido (Barea *et al.*, 2005), es importante estudiar los mecanismos que intervienen para entenderlas en profundidad. Presumiblemente, el contacto directo entre las hifas y las bacterias facilita las interacciones, en cuyo proceso pueden intervenir diferentes señales o el intercambio de metabolitos (Toljander, 2005). La adhesión bacteriana a las estructuras del hongo puede ser un

prerrequisito para las para que se expresen tales interacciones entre estos microorganismos. Además se ha propuesto que las hifas pueden ser utilizadas como vehículo para la dispersión de bacterias (Bianciotto *et al.*, 1996b).

Dada la importancia de las técnicas basadas en la microscopía confocal y el uso de proteínas fluorescentes para la investigación en interacciones microorganismo-microorganismo se dedican sub-apartados específicos a comentar esas técnicas

Se ha propuesto que la adhesión y colonización de bacterias MHB metabólicamente activas a la rizoplanea o superficie micorrícica es necesaria para afectar a la relación simbiótica. Este requisito se ha visto en la cepa *Pseudomonas fluorescens* BBc6 descrita como MHB, la cual se adhiere a las hifas de diferentes ectomicorrizas, mientras que otras cepas no MHB no tienen la capacidad para adherirse a las estructuras fúngicas de ectomicorrizas. También se han descrito bacterias MHB sobre hongos AM (Duponnois *et al.*, 2003; Pacovski, 1989; Mamatha, *et al.*, 2002) que pueden incrementar el crecimiento vegetal y la colonización micorrícica.

### ***Microscopía confocal***

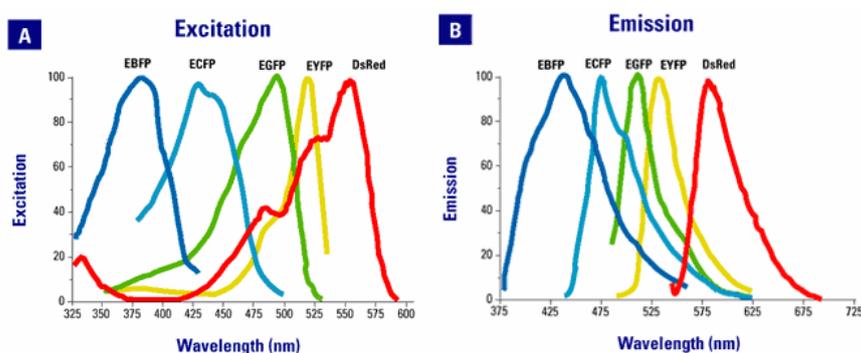
Como es bien conocido, la observación microscópica es posible cuando se dispone de objetos pequeños o de secciones finas del material a observar. El microscopio de fluorescencia permite observar al mismo tiempo todo el grosor de una célula ya que la discriminación en planos o imágenes independientes siempre es posible, aunque técnicamente complejo, mediante la obtención de secciones correspondientes a planos consecutivos. La microscopía de fluorescencia confocal aporta otra solución mucho más directa. Esta técnica se basa en el empleo de fuentes de iluminación de gran intensidad y sincrónicas, de un juego de diafragmas y de un sistema de captación de imagen electrónico, lo que permite la obtención de imágenes de secciones ópticas finas. A partir de series de secciones ópticas de este tipo, obtenidas a diferentes profundidades y archivadas en un ordenador, resulta posible reconstruir una imagen tridimensional.

### ***Uso de proteínas fluorescentes para el seguimiento de las bacterias en la rizosfera/micorrizosfera***

Desde que se aisló la GFP (Green Fluorescent Protein) de *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992) y su posterior expresión en otros microorganismos (Chalfie *et al.*, 1994), la aplicación de la GFP como biomarcador en multitud de organismos tanto eucariotas como procariotas, ha incrementado de manera incesante (Stoltzfus *et al.*, 2000). La gran ventaja de la GFP como sistema marcador, es que no necesita ningún cofactor o sustrato adicional. Además, el

comportamiento de las bacterias portadoras del gen *gfp* pueden ser analizadas a un nivel individual de forma no lesiva para la célula.

El extendido uso de la GFP como una poderosa herramienta en el marcaje celular ha provocado una enorme demanda para poder seguir y distinguir varios marcajes simultáneamente. Recientemente se han desarrollado para cubrir esta demanda, una serie de variantes de la GFP, denominadas EBFP (azul), EGFP (verde), EYFP (amarilla), ECFP (cian) así como la DsRed una proteína roja procedente un coral (*Discosoma sp.*) (Tsien, 1998; Matz *et al.*, 1999). La bibliografía indica que la mejor combinación de colores para ensayos de coinoculación con la EYFP (ya que la cepa genéticamente modificada se encuentra marcada con la EYFP) es la DsRed, y en caso de no disponer de ella, la ECFP preferentemente o la EGFP en su defecto (figura 7.1) (CLONTECHniques, 1999 y 2001). Esto se comprobó mediante la visualización de las colonias en un estereomicroscopio de fluorescencia (Figura 7.2)



**Figura 7.1:** Espectros de excitación (A) y de emisión (B) de las proteínas fluorescentes EGFP, ECFP, EYFP y DsRed

## 5.2 Material y Métodos

### 5.2.1 Obtención de *A. brasilense* Sp245 marcado con las diferentes proteínas fluorescentes por conjugación triparenteral

Antes de llevar a cabo los ensayos de transformación para dotar a *A. brasilense* Sp245 con las proteínas fluorescentes apropiadas, se procedió a comprobar que esta bacteria no presentaba autofluorescencia a las longitudes de onda de excitación de las proteínas fluorescentes que se pretendían emplear en los ensayos. Para esto se observaron al estereomicroscopio de fluorescencia (Leica MZ16 F) las colonias crecidas en placa tanto con medio LB como con MMAB. Posteriormente, se comprobó que ninguna de las cepas seleccionadas para la

conjugación triparental crecían en el medio selectivo MMAB con los antibióticos de selección.

Para aumentar la seguridad de que no creciera ninguna colonia no transformada en el medio selectivo se obtuvo una cepa de *A. brasilense* Sp245 resistente a Rif 50 de manera espontánea. Así la cepa transconjugante debería ser resistente a Tc y Rif. Tras la conjugación se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en MMAB Tc-Rif. Se comprobó la emisión de fluorescencia correspondiente bajo el estereomicroscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

### 5.2.2.1. Experimento Conjugación triparental

Debido a las limitaciones técnicas de los equipos de microscopía en cuanto a juegos de filtros disponibles al comienzo del diseño experimental, se decidió realizar la conjugación de *A. brasilense* con las cuatro proteínas fluorescentes. Una vez obtenidas estas cepas, se seleccionaron las marcadas con EYFP y ECFP para los experimentos.

Los plásmidos utilizados se describen en la tabla 2 de Material y Métodos generales (Bloemberg *et al.*, 2000). Estos plásmidos, que contienen los genes que codifican las diferentes proteínas fluorescentes, se transfirieron a la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 Rif mediante conjugación triparental usando como célula auxiliar *E. coli* DH5  $\alpha$  que porta el plásmido pRK2013. Se siguió el protocolo que se describe a continuación.

### 5.2.2.2. Conjugación triparental de *A. brasilense* Sp245

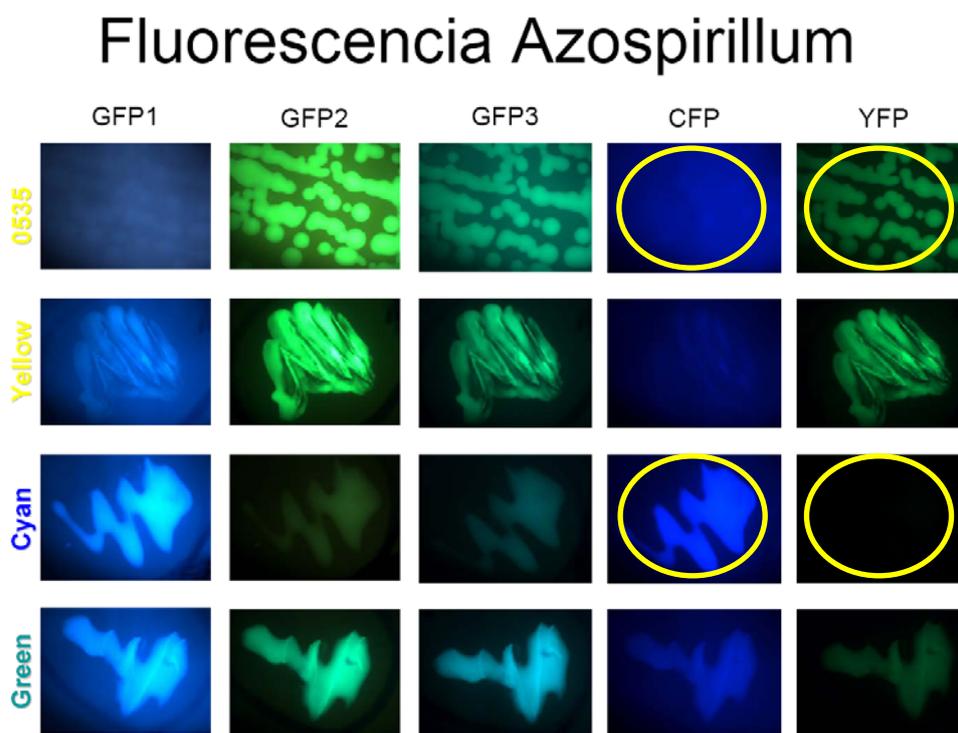
Los cultivos se refrescaron haciendo una dilución 1:10 (v:v) a partir de un preinoculo. Las cepas donadora y auxiliar se hicieron crecer con los antibióticos correspondientes hasta una  $D.O_{600} = 0.2$ . Con la cepa receptora se procedió de la misma forma, pero llevándola hasta una  $D.O_{600} = 1$ . Se tomó 1ml de estos cultivos y se centrifugaron. El "pellet" se lavó con 1ml de LB dos veces para eliminar las trazas de antibiótico y por último se resuspendió en 500 $\mu$ l de LB. Se mezclaron 400 $\mu$ l de cada una de las cepas. Con estas cantidades se obtuvo una proporción 1:1:5, (Donadora: Auxiliar: Receptora). La mezcla se centrifugo y resuspendió en un volumen final de 20 $\mu$ l de LB. Los 20  $\mu$ l se depositaron sobre un filtro estéril de 22 $\mu$ m de poro, colocado sobre una placa de LB sin antibióticos. Se incubó durante 48h a la temperatura óptima de la cepa receptora. El filtro se traspasó a un tubo eppendorf con 1ml de LB líquido y mediante vortex se resuspendieron las células del filtro. Se hicieron diluciones seriadas para sembrar en una placa de MMAB (medio selectivo para *Azospirillum*) con los antibióticos adecuados para seleccionar las células transconjugantes. (Tc, Rif).

Mediante este protocolo se obtuvieron las cepas que contenían el plásmido necesario para expresar las correspondientes proteínas fluorescentes derivadas de la GFP (tabla 1, punto 3 de Material y Métodos generales). Las transformaciones con EYFP, EGFP y ECFP resultaron efectivas, mientras que la transformación de *A. brasilense* Sp245 Rif con la proteína DsRed no lo resultó. Este hecho probablemente se deba a la inestabilidad que presenta a la temperatura de cultivo adecuada para *Azospirillum*, (Bloemberg *et al.*, 2000; Guo-Zhu *et al.* 2002).

### 5.2.2.3. Estabilidad de los plásmidos en *A. brasilense* sp245

La estabilidad de los plásmidos pMP4641, pMP4655, pMP4658 en *A. brasilense* Sp245 Rif se determinó mediante su crecimiento en placa sin la presión selectiva de los antibióticos (Tc y Rif). Tras 20 replicaciones en placa, se comprobó el fenotipo de fluorescencia permanecía en las colonias (Ramos *et al.*, 2002). No es de extrañar que el fenotipo se mantuviera puesto que los plásmidos empleados proceden del plásmido pME6010, un plásmido estable en la mayoría de las bacterias rizosféricas (Heeb *et al.*, 2000)

Las colonias se conservaron en gliceroles para su posterior uso en el ensayo de microscopía confocal.



**Figura 7.2:** Comprobación de la fluorescencia de las cepas de *Azospirillum* transformadas con los diferentes filtros. Las bacterias que expresan las proteínas EYFP y ECFP no presentan fluorescencia cruzada cuando se visualizan con sus correspondientes filtros.

### **5.2.2. Observación de estructuras fúngicas y raíces colonizadas**

Para proceder a la obtención del material, las placas de cultivo monoxénico ya establecidas se inocularon las bacterias y se incubaron durante 10 días a 24°C (protocolo 4). Las raíces e hifas se extrajeron mediante el procedimiento descrito a continuación.

#### **5.2.2.1. Extracción de material a partir de cultivo monoxénico**

Diez días después de la inoculación bacteriana en las placas del cultivo monoxénico ya establecidas, se procedió a la recuperación de las raíces, hifas y esporas para su observación al microscopio de fluorescencia y confocal.

El material biológico se recuperó siguiendo el método descrito por Bago *et al.*, (2000), mediante la disolución del medio de cultivo con citrato sódico. Con una hoja de bisturí se cortó el medio y se dispuso en un matraz erlenmeyer con 50ml de citrato sódico 10mM pH 6.0 y se mantuvo en agitación suave hasta la completa disolución del medio. Los fragmentos de raíz de aproximadamente 1cm procedentes del cultivo monoxénico inoculado durante 10 días con las bacterias marcadas con las dos variantes de la GFP, se montaron en portas con una gota de PBS-Glicerol y se cubrieron con un cubreobjetos. Los cubreobjetos se sellaron con laca de uñas para evitar la desecación de la muestra y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su visualización.

---

Citrato sódico 10mM

PBS-Glicerol: NaCl 8.8g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.39g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.24g; a pH 7,2 y glicerol al 50%

### **5.2.3. Uso del Microscopio Confocal**

Para su observación, se utilizó un microscopio láser confocal de sistema espectral, Leica TCS SL equipado con láser de argón, cuya banda de 513nm se utilizó para excitar la ECFP y la de 488nm para excitar la EYFP. Concretamente, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron (512/529) y (434/477) para EYFP y ECFP respectivamente. Los objetivos empleados para la observación fueron 40x y 63x ambos de inmersión.

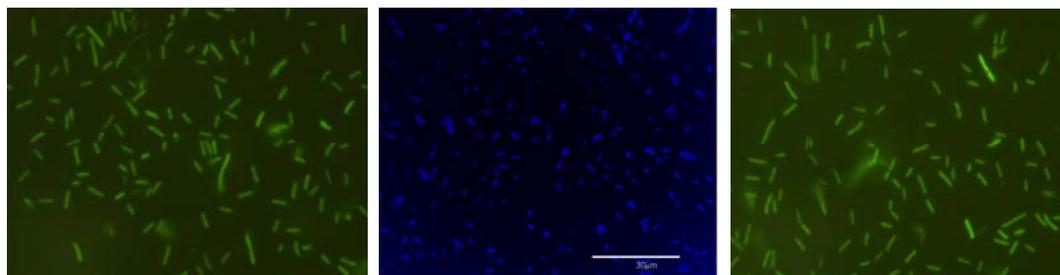
En los casos en que se visualizaron las dos proteínas fluorescentes en la misma muestra, ambas fueron excitadas secuencialmente (no simultáneamente) para evitar interferencias entre canales. Los intervalos de longitud de onda dentro de los cuales se captó la emisión de fluorescencia fueron asimismo seleccionados para evitar al máximo dichas posibles interferencias.

Las imágenes obtenidas son resultado de una reconstrucción tridimensional por superposición de las diferentes imágenes obtenidas. La distancia entre imágenes en el eje “y” varió de 1.99 $\mu$ m a 0.74 $\mu$ m, obteniéndose las reconstrucciones tridimensionales por la superpreposición de 10 a 20 imágenes según el caso. Las imágenes tridimensionales se realizaron usando el programa de análisis de imagen de Leica Confocal Software Lite.

### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Comprobación de la fluorescencia de *A. brasilense* transformados

Se comprobó la fluorescencia de las diferentes cepas obtenidas tras la transformación con los plásmidos portadores de los genes de fluorescencia (Figura 7.2). Para observar las células individualmente, las colonias se extendieron en un porta y se observaron al microscopio de fluorescencia (figura 7.3).



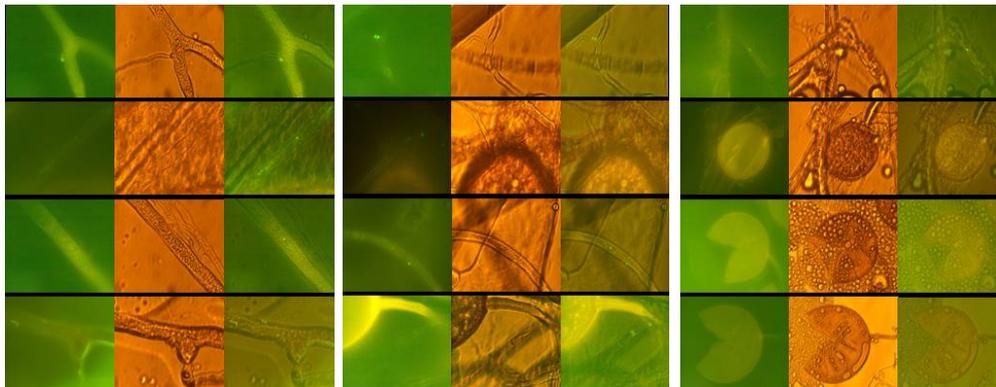
**Figura 7.3:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de *A. brasilense*. (A) Células de *A. brasilense* 0535 (EYFP) 100x inmersión. (B) Células de *A. brasilense* Sp245-41 (ECFP) 40x inmersión. (C).Células de *A. brasilense* Sp245-58 (EYFP) 100x inmersión

#### 5.3.2. Determinación de la capacidad de adhesión bacteriana a estructuras fúngicas.

El objetivo de la primera inoculación de cultivo monoxénico fue la determinación de la adhesión por ambas cepas en estructuras fúngicas. Tras la inoculación del cultivo monoxénico con concentraciones similares de las cepas GM y WT (protocolo 4) se procedió a la extracción del micelio del medio de cultivo (protocolo 7.2.2.1).

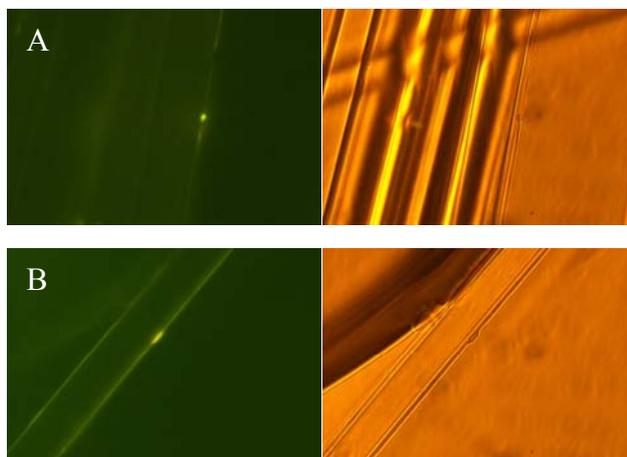
El micelio extraído se observó al microscopio óptico de fluorescencia tras 7 días de incubación. Dicha observación indicó que ambas cepas se adhieren a las estructuras fúngicas siguiendo un patrón de colonización similar. Se pudo

comprobar que la cantidad de células bacterianas adheridas a las estructuras del hongo eran similares a en ambas bacterias (7.3). En todos los campos observados las bacterias se localizan en la superficie del micelio mientras que en la superficie de las esporas no se observó adhesión. En este caso, todas las esporas que se observaron tenían su superficie libre de bacterias localizándose éstas en la superficie de las hifas. Las bacterias se localizaron tanto en la superficie como en las ramificaciones de las hifas y esta localización se repitió para ambas cepas, lo que se observó, como se comentará más adelante, en posteriores inoculaciones para su observación al microscopio confocal.



**Figura 7.3:** Adhesión de *Azospirillum* a estructuras fúngicas.

Para comprobar la adhesión de *Azospirillum* a un sustrato inerte se seleccionó la lana de vidrio por tener una superficie lisa y un diámetro similar al de las hifas de *G. intrarradices* (figura 7.4). Para ello se inocularon ambas cepas a concentraciones similares sobre lana de vidrio estéril y se incubaron según el protocolo descrito por Toljander *et al.* (2006).



**Figura 7.4:** Imágenes de fluorescencia y luz transmitida de fibras de lana de vidrio inoculadas con (A) *A. brasilense* Sp245 y (B) Sp245-58, ambos marcados con EYFP.

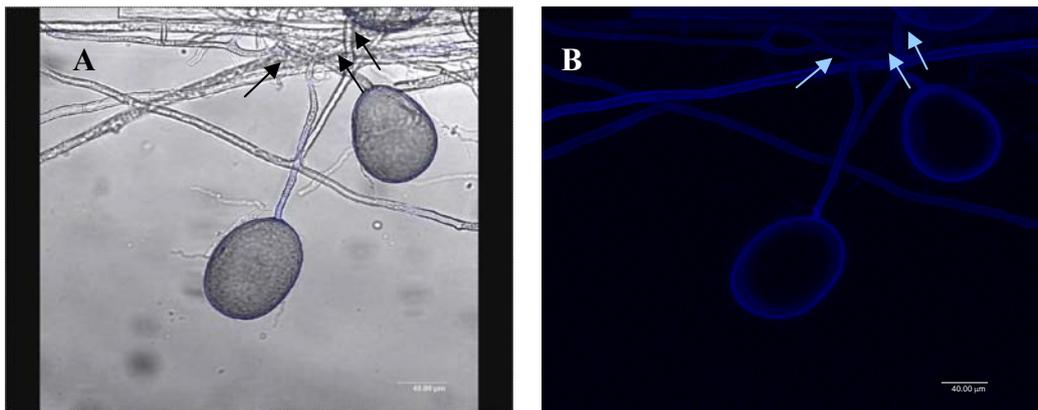
Durante la observación de las fibras de vidrio incubadas con las dos cepas, se comprobó que ninguna de las dos cepas se adhirió a la superficie de la lana de vidrio y solamente se pudieron localizar dos bacterias adheridas a la lana a lo largo de toda la longitud de las fibras observadas. Este efecto se ha descrito con otros géneros bacterianos (Toljander *et al.*, 2006).

### **5.3.3. Visualización y comparación del patrón de colonización de *A. brasilense* WT o GM**

El objetivo del presente experimento fue evaluar la capacidad de colonización y el patrón de colonización que presentan tanto la cepa silvestre como la cepa modificada genéticamente. Para cumplir este objetivo se planteó la inoculación tanto por separado como conjuntamente de dichas cepas. Debido a las dificultades que entraña la detección de bacterias marcadas con los derivados de la GFP en raíces crecidas en suelo, se optó por la inoculación de un cultivo monoxénico. En primer lugar se comprobó que *A. brasilense* no crecía en el medio M del cultivo monoxénico. Se observó que la bacteria solamente se desarrolla alrededor de las hifas y raíces aprovechando los exudados que estas aportan.

#### **5.3.3.1. Determinación de la colonización bacteriana sobre estructuras fúngicas**

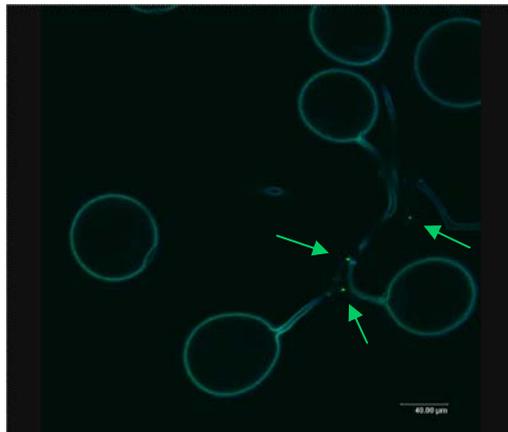
La visualización de las hifas inoculadas con *A. brasilense* Sp245-41 (marcado con la ECFP) bajo el microscopio confocal a la longitud de onda de excitación correspondiente, mostró una ligera autofluorescencia de las estructuras fúngicas. Esto es debido a que el cultivo bacteriano a partir del cual se realizó la inoculación no presentaba una intensa fluorescencia. Para resolver el problema hubo de ajustarse el láser de excitación y el rango para recoger la emisión prácticamente al máximo. De esta forma sí se recogió la señal emitida por la bacteria marcada. Para la siguiente inoculación con esta bacteria, se seleccionó otra colonia que sí presentó una fluorescencia adecuada.



**Figura 7.5:** Reconstrucción tridimensional de esporas de *G. intraradices* colonizadas por Sp245-41. La imagen corresponde a la combinación de la imagen formada por 10 fotografías de luz transmitida mas otras 10 de fluorescencia.

Se puede observar como la bacteria coloniza las hifas preferentemente (Figura 7.5A). La autofluorescencia de las estructuras fúngicas es debida a la intensidad a la que hubo de ajustarse el láser de Argón y el alto porcentaje de emisión recogida. La selección de estos parámetros tan altos fue debida a que la colonia de *A. brasilense* Sp245-41 seleccionada para la inoculación presentaba una baja fluorescencia.

La colonización de la hifa se observa mejor eliminando la imagen de luz transmitida de la reconstrucción (figura 7.5B).

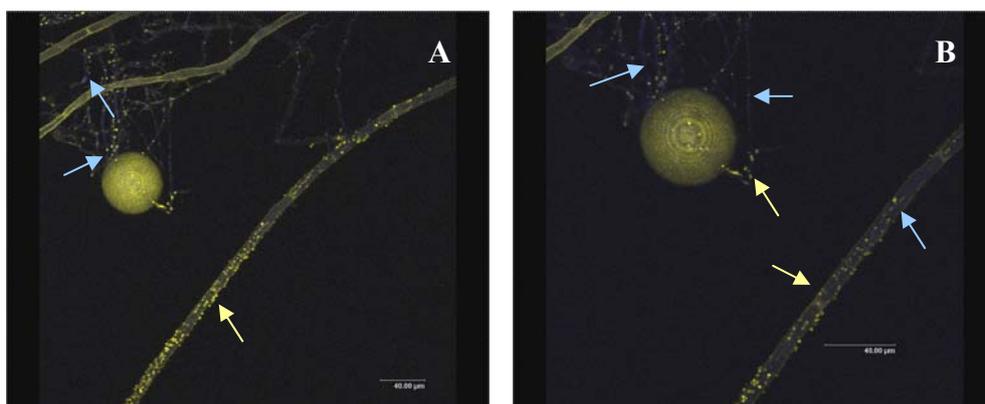


**Figura 7.6:** Imagen de fluorescencia de estructuras fúngicas colonizadas por *A. brasilense* 0535 (EYFP). 40x inmersión.

En el caso de la inoculación con la cepa GM (EYFP) no se presentó el problema descrito anteriormente aunque para la mejor visualización de la fluorescencia se procedió a forzar los parámetros anteriormente descritos.

Al igual que en la reconstrucción de Sp245-41, en el caso de la bacteria GM, se observa que la bacteria coloniza preferentemente la hifa frente a la espora (figura 7.6).

De la misma manera se procedió a visualizar la inoculación del cultivo monoxénico con una mezcla de las bacterias GM 0535 (EYFP) y WT Sp245-41 (ECFP) (figura 7.7). En la reconstrucción tridimensional se aprecia que ambas bacterias se adhieren a las hifas del hongo preferentemente, al igual que cuando se procedió a inocular las bacterias por separado. La mayor señal de 0535 enmascara un poco la señal emitida por la Sp245, pero se observa claramente que se asocia de la misma manera que la cepa modificada genéticamente al micelio del hongo. Aunque se aprecia una mayor cantidad de bacterias pertenecientes a la cepa GM, esto es debido a probablemente a una mayor concentración de inóculo así como a la menor emisión de fluorescencia que presenta la cepa WT. Hay que mencionar que la recuperación de inóculos en raíces del primer ensayo indica que ambas cepas colonizan/persisten a niveles similares, por lo que la aparente mayoría de células correspondientes a la cepa GM seguramente se debe a la cantidad de inóculo inicial así como a la dificultad para observar apropiadamente las de la cepa WT.

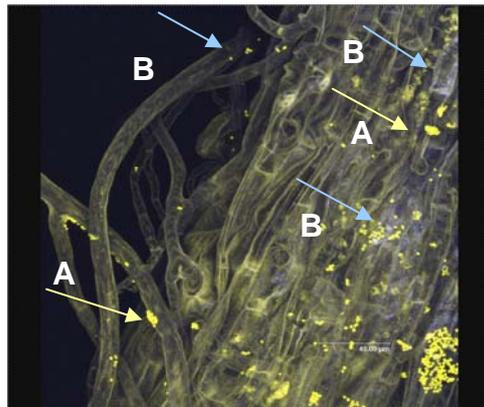


**Figura 7.7:** (A) Reconstrucción tridimensional de ambos canales (40x). (B) Ampliación de un área de la imagen anterior (63x). En la imagen se observa con mayor nitidez la adhesión de las células de ambas cepas sobre la hifa extraradical del hongo (WT azul y GM amarillo).

### 5.3.3.2. Determinación de la colonización bacteriana sobre raíces micorrizadas

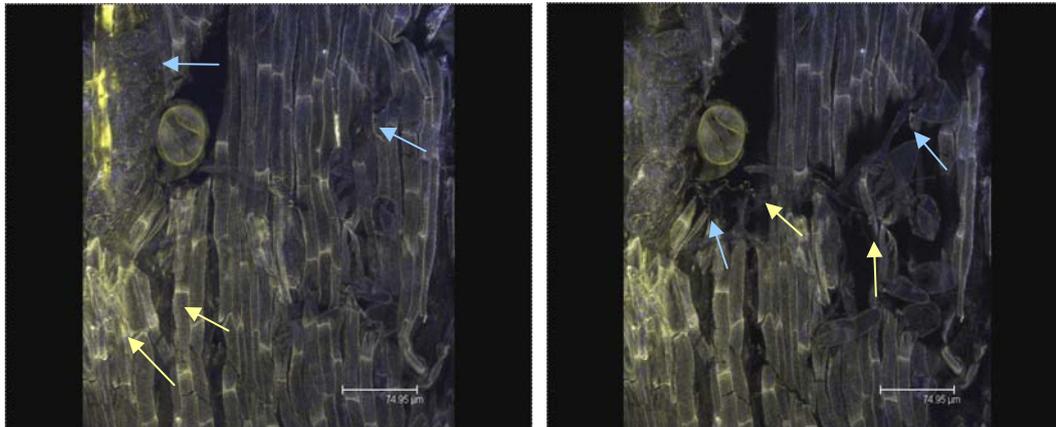
Para comprobar la colonización de las dos cepas sobre las raíces del cultivo monoxénico, se procedió a recuperar el material vegetal de la misma manera que para la observación de las estructuras fúngicas. Las raíces se depositaron sobre un portaobjetos y se cubrieron con PBS-Glicerol. En la primera imagen (figura 7.8)

nos encontramos con el mismo problema descrito anteriormente sobre la fluorescencia de la cepa marcada con ECFP.



**Figura 7.8:** Reconstrucción tridimensional de un fragmento de raíz de zanahoria colonizada por *G. intrarradices* e inoculada con una mezcla de las cepas WT(A) y GM (B). 63x inmersión.

En la imagen se puede observar cómo ambas bacterias, GM (EYFP) y WT (ECFP) se encuentran adheridas tanto a la raíz (mas concretamente en los espacios intercelulares) como al micelio extraradical (A). En la parte inferior de la imagen se observa una concentración de células de la cepa GM asociada a una hifa intraradical. Esto parece indicar que la hifa pudiera actuar como vehículo de colonización del interior de la raíz (B). Esta observación parece verificarse en lo observado en la imagen 7.9.

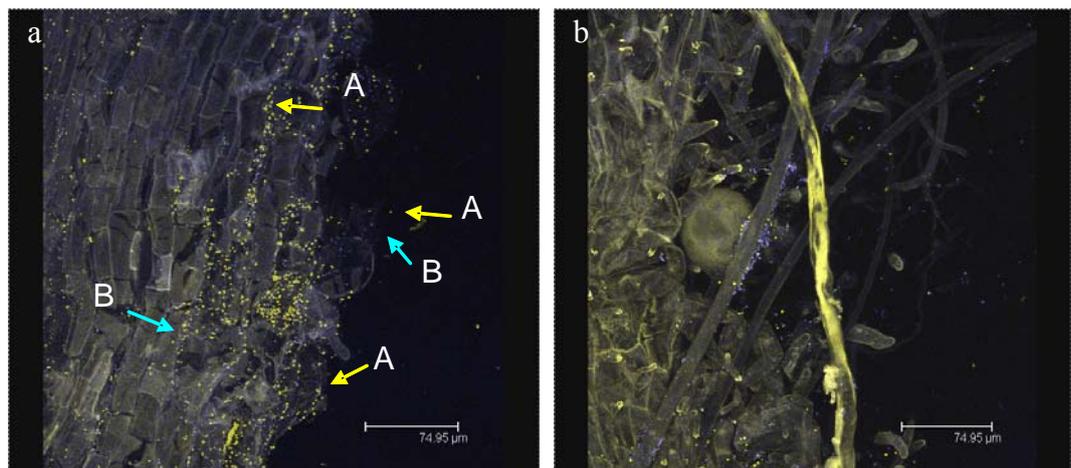


**Figura 7.9:** (A) Reconstrucción tridimensional de la superficie radical de zanahoria colonizada por *G. intrarradices* e inoculada con un mezcla de cultivos GM y WT. Ambas bacterias colonizan la superficie radical, localizandose principalmente en los espacios intercelulares. 40x inmersión. (B) La presente reconstrucción corresponde al mismo campo que la anterior, con la salvedad de profundizar en el interior de la raíz. 40x inmersión.

Se observa que las bacterias tanto GM como WT colonizan la hifa intrarradical. Esto apoya la teoría de que algunas rizobacterias pueden usar las hifas de los hongos micorrícicos como vehículos para la colonización intrarradical (Bianciotto *et al.*, 2000).

En la figura 7.10 se puede observar como ambas bacterias se distribuyen de la misma manera. Ambas colonizan ampliamente la superficie radical, acumulándose en los espacios intercelulares (7.10a). Ambas bacterias además, colonizan la superficie de las hifas (7.10b) como se ha descrito en imágenes anteriores. En la imagen 7.10b se observa una hifa muerta, la cual no es colonizada, al igual que se observa en las imágenes de lana de vidrio.

En la capacidad de adhesión se ha dado gran importancia a los polisacáridos extracelulares, que juegan un papel fundamental en la adhesión de *Azospirillum* y *Rhizobium* a las estructuras micorrícicas (Bianciotto *et al.*, 2001). Es obvio que el efecto micorrizosférico es debido al hecho de que el micelio secreta compuestos carbonados ricos en energía que son responsables del incremento en el crecimiento y actividad de microorganismos rizosféricos en la hifosfera (Barea *et al.*, 2002) aunque notablemente inferior al del suelo rizosférico, ya que el n° de microorganismos aislados de esta fracción es mucho menor, probablemente debido a la menor secreción de estos compuestos.



**Figura 7.10:** Raíz con una espora de *G.* intrarradices y micelio colonizadas por una mezcla de *Azospirillum* WT (A) y GM (B). (a) Ambas bacterias colonizan de forma similar la superficie radical, localizándose preferentemente en los espacios intercelulares. 40x inmersión. (b) Las dos cepas colonizan igualmente la superficie del micelio extrarradical. 63x inmersión.

## 5.4. *Discusión*

La colonización radical por parte de hongos MA y los subsiguientes efectos positivos derivados de esta asociación, dependen de la viabilidad y supervivencia de los propágulos MA. La viabilidad e infectividad de estos propágulos puede alterarse por diferentes estreses bióticos y abióticos. Uno de los factores que puede afectar a la germinación y establecimiento de la MA es la interacción con otros microorganismos del suelo como bacterias y hongos (Daniels & Menge, 1980; Walley & Germida, 1996). Estos organismos asociados pueden encontrarse intracelularmente (Bianciotto *et al.*, 1996a) o colonizando externamente las estructuras micorrícicas (Azcón, 1987; Walley & Germida, 1996; Budi *et al.*, 1999). Aunque aún se desconoce la magnitud de la importancia del contacto directo entre bacterias, hongos y plantas, se presume que la capacidad de adhesión de las bacterias es de vital importancia (Toljander *et al.*, 2006). De hecho, se supone que las interacciones físicas pueden afectar a las propiedades tales como el biocontrol de patógenos por la ocupación de espacios.

Se ha comprobado que la modificación genética de *Azospirillum* no interfiere en su capacidad de adhesión. Este punto era de esperar, debido a que la modificación genética ha sido dirigida hacia el incremento en la expresión del gen *ipdC*, aunque esto era necesario comprobarlo. Se puede observar que la capacidad de la cepa GM para adherirse a un sustrato biológico es similar a la de la cepa WT, verificando lo anteriormente expuesto.

Las evidencias experimentales presentadas (fotos) demuestran que las bacterias del género *Azospirillum* se adhieren tanto a las estructuras fúngicas como a las raíces colonizadas. Russo *et al.*, (2005) observaron la colonización de raíces de maíz inoculadas con la cepa GM Sp245 (pFAJ0535) a los 14 días de la inoculación. En dicho estudio, se pudo comprobar que la bacteria coloniza ampliamente la superficie radical, con una acumulación de bacterias en los espacios intercelulares de la epidermis. En el presente estudio se ha observado que tanto la cepa WT como la GM siguen un patrón similar en cuanto a la colonización, demostrándose que dichas bacterias se adhieren preferentemente a la superficie de las hifas en toda su longitud. Ello sugiere que las hifas pueden ser utilizadas por la bacteria para llegar a capas más internas de la epidermis radical donde colonizar un nuevo nicho ecológico salvaguardado de la competencia que se presenta en el exterior (Bianciotto *et al.*, 1996a). De hecho, se han encontrado ambas cepas en el interior de la raíz asociadas a hifas intrarradicales.

Ambas cepas han demostrado una preferencia para adherirse a estructuras metabólicamente activas. Mientras que se observó que las dos cepas se adherían a la superficie de las hifas y raíces no se observó ninguna bacteria asociada a las fibras de la lana de vidrio. Este mismo comportamiento ha sido observado con otras especies bacterianas utilizando como sustratos fibra de vidrio o hifas muertas

de diferentes hongos tanto arbusculares como ectomicorrícicos (Bianciotto *et al.*, 1996a; Toljander *et al.*, 2006). El papel de la quimiotaxia bacteriana hacia los exudados radicales puede explicar esta preferencia por las estructuras vivas.

La localización de *Azospirillum* en la raíz se ha descrito en numerosos estudios empleando tanto proteínas fluorescentes como fusiones *gusA*, localizándose en pelos radicales, zonas apicales y raíces laterales (Vande Broek *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 2002; Assmus *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha descrito que *Azospirillum* puede llegar a colonizar el interior de la raíz. (Döbereiner *et al.*, 1995a) han sugerido que el origen de esta colonización sea debida a la presencia de lesiones o grietas, generalmente en zonas de emergencia de raíces laterales. Se ha visto que estas zonas son lugares frecuentes de infección de especies de los géneros *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Azoarcus* (Döbereiner, 1992; Egner *et al.*, 1998). Es importante destacar que *Azospirillum* se ha encontrado en estas zonas (Ramos *et al.*, 2002) donde se ha descrito un aumento de los exudados radicales, que pueden ejercer de quimioatrayentes (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

La observación de las bacterias WT y GM en el interior de la raíz y asociada hifas fúngicas podría deberse a una lesión en ésta. Sin embargo, teniendo en cuenta que la inoculación se realizó sobre la superficie de la placa y que no se alteró la raíz, la localización observada puede explicarse mediante la movilidad por quimiotaxis, usando como vía de acceso la hifa intraradical.



## ***IV. Conclusiones***



## IV. CONCLUSIONES

1. La modificación genética en llevada a cabo en *Azospirillum brasilense* Sp245 induce la síntesis de ácido indol-acético a partir de triptófano en presencia de azúcares.
2. La supervivencia de *Azospirillum brasilense* no se ve afectada afecta por la modificación genética en rizosfera de trigo y maíz.
3. La inoculación de *Azospirillum* WT y GM incrementan la longitud radical de plantas de maíz y trigo y la colonización micorrícica de ambas plantas.
4. La inoculación de *Azospirillum* WT y GM incrementa las actividades enzimáticas hidrolasas (fosfatasa y succinato deshidrogeasa) del suelo.
5. La inoculación de *Azospirillum* incrementó la formación de propágulos infectivos, la formación de micelio externo y la colonización de las plantas, así como la actividad fosfatasa alcalina de los hongos MA.
6. La inoculación de *Azospirillum* WT y GM mantuvo e incluso incrementó la producción de grano de las plantas de trigo y de maíz.
7. La inoculación de *Azospirillum* WT y GM mantuvo e incluso incrementó la formación de esporas de hongos MA en la rizosfera de las plantas de trigo y de maíz.
8. La inoculación de *Azospirillum* pFAJ5005 no perjudicó a la diversidad de hongos MA en las rizosferas de trigo y maíz.
9. La capacidad de colonización ambas cepas fue similar, indicando que la modificación genética no influye en la capacidad de adhesión.
10. *Azospirillum* es capaz de adherirse a la superficies fúngicas de G. intrarradices, mostrando especificidad sobre estructuras metabólicamente activas como el micelio frente a esporas



## ***V. Bibliografía***



## V. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Salam, M.S. and Klingmüller, W.** (1987). Transposon Tn5 mutagenesis in *Azospirillum lipoferum*: isolation of indole acetic acid mutants. *Molecular Genetics and Genomics* 210 (1): 165–170.
- Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S. and Kato, H.** (1997). Biocontrol of bacteria wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonads. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Present Status and Future Prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds): 120-123. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P. and Bakker, P.A.H.M.** (1997). Biological control of *Fusarium* wilts: Toward development of commercial products. In: *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. G. J. Boland and L. D. Kuykendall (eds.): 15-36. Marcel Dekker, New York.
- Al-Nihidh, S.I., and Gomah, A.H.M.** (1991). Response of wheat to dual inoculation with VA –mycorrhiza and *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent, *Arid Soil Res. Rehabilit.* 5:83.
- Altieri MA.** (1994). Sustainable Agriculture. *Enc. Agricultur. Sci.* 4: 239-247.
- Andrade, G., Linderman, R. G., and Bethlenfalvay, G. J.** (1998). Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Soil* 202:79–87.
- Antonyuk, L.P., Fomina, O.R., Galkin, M.A. and Ignatov, V.V.** (1993) The effect of wheat germ agglutinin on dinitrogen fixation, glutamine synthetase activity and ammonia excretion in *Azospirillum brasilense* Sp245. *FEMS Microbiology Letters* 110: 285-290.
- Antonyuk, L.P., Fomina, O.R., Kalinina, A., Semenov, S., Nesmeyanova, M. and Ignatov, V.** (1995). Wheat lectin possibly serves as a signal molecule in the *Azospirillum*-wheat association. In: *Azospirillum VI and Related Microorganisms*. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, and M. de Zamaroczy (eds.): 319-325. Springer, Berlin.
- Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R. and Hartmann, A.** (1995). *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labelled, rRnatargeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1013–1019.

- Azcón, R.** (1987). Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* in vitro: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil biology and biochemistry* 19: 417-419.
- Azcón-Aguilar, C. and Barea, J.M.** (1992). Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. *Mf allen* (ed.) Chapman & Hall, New York. pp. 47-60.
- Azcón-Aguilar, C.**, (2004b). Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertificationthreatened semiarid Mediterranean ecosystem *Applied Soil Ecology* 25 123–133
- Bago, B., Shachar-Hill, Y. and Pfeffer, P.E.** (2000). Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizas with NMR spectroscopy. In: *Current advances in mycorrhizae research*. G.K. Podila and D.D.J. Douds (eds.):111-126. APS press. St. Paul.
- Balota, E.L., Lopes, E.S., Hungria, M. and Döbereiner, J.** (1995). Interactions and physiological effects of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in cassava plants. *Pesq. Agropec. Bras.* 30: 1335-1345.
- Bar, T. and Okon, Y.** (1992). Induction of indole-3-acetic acid síntesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* Sp 7. *Symbiosis* 13: 191-198.
- Barea, J. M. and Azcón-Aguilar, C.** (1982). La rizosfera: interacciones Microbio Planta, The rhizosphere: microbe-plants interactions. *Anales de Edafología y Agrobiología.* 41: 1517-1532.
- Barea, J.M.** (1997). Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Present Status and Future Prospects*. A. Ogoshi, L. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondon y S. Akino (eds.): 150-158. OCDE, Paris.
- Barea, J.M.** (1998). *Biología de la rizosfera. Investigación y Ciencia. Scientific American* 256: 74-81.
- Barea, J.M.** (2000). Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: *Biological Resource Management: Connecting Science and Policy (OECD)*. J. P. Toutant, E. Balazs, E. Galante, J. M. Lynch, J. S. Schepers, D. Werner y P. A. Werry (eds.): 110-125. INRA, Editions and Springer.

- Barea, J.M. and Jeffries, P.** (1995) Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. In: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. A. Varma y B. Hock (eds.): 521-559. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Barea, J.M. and Olivares, J.** (1998). Manejo de las propiedades biológicas del suelo. In: *Agricultura sostenible*. R.M. Jiménez Díaz, J. Lamo de Espinosa, (eds.): 173-193. Mundi prensa. Madrid.
- Barea, J.M., Azcón R. and Azcón-Aguilar C.** (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria In: *Plant surface microbiology*. A. Varma, L. Abbott, D. Werner, R. Hampp, (eds.): 351-371. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Barea, J.M., Azcón R. and Azcón-Aguilar C.** (2005a). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. F. Buscot, S. Varma (eds.): 195-212. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Barea, J.M., Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C.** (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 343-51.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. and Azcón, R.** (1997). Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. A. C. Gange y V. K. Brown (eds.): 65-77. Backwell Science, Cambridge.
- Barea, J.M., Bonis, A.F. and Olivares, J.** (1983). Interactions between *Azospirillum* and VA-mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass, *Soil Biol. Biochem.* 15:705.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417):1761-1778. falta a, b
- Barea, J.M., Werner D., Azcón-Aguilar, C. and Azcón, R.** (2005b). Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing symbiosis in sustainable agriculture. In: *Agriculture forestry, ecology and the environment*. D. Werner, W.E. Newton (eds.). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Basaglia M, Casella S, Peruch U, Poggiolini S, Vamerli T, Mosca G, Vanderleyden J, De Troch P, Nuti MP** (2003) Field release of genetically marked *Azospirillum brasilense* in association with *Sorghum bicolor* L. *Plant and Soil* 256 (2): 281-290
- Bashan Y, and Holguin G.** (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1225-1228.
- Bashan, Y.** (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4): 729-770.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L.E.** (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2637-2643.
- Bashan, Y. and Holguin, G.** (1997a). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990- 1996). *Canadian Journal Microbial.* 43: 103- 121.
- Bashan, Y. and Holguin, G.** (1997b). Short- and medium- term avenues for *Azospirillum* inoculation. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds.): 130-149. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Bashan, Y. and Levanony, H.** (1987). Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbial.* 133: 3473-3480.
- Bashan, Y. and Levanony, H.** (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36: 591-608.
- Bashan, Y., Holguin, G. and de-Bashan, L.** (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) *Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol.* 50(8): 521-577.
- Benbrook, C.M.** (1991). Introduction. Sustainable agriculture research and education in the field workshop proceedings. Board on Agriculture, National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press.

- Benbrook, C.M.** (1999). World Food System Challenges and Opportunities: GMOs, Biodiversity, and Lessons from America's Heartland. In: World Food System Challenges and Opportunities: GMOs, Biodiversity, and Lessons from America's Heartland <http://www.pmac.net/IWFS.pdf>
- Benizri, E., Baudoin, E. and Guckert, A.** (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Technol.* 11: 557-574.
- Bethlenfalvay, G.J.** (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing legumes: problems and prospects. *Methods Microbiol.* 24: 375-389.
- Beyeler, M., Michaux, P., Keel, C. and Haas, D.,** (1997). Effect of enhanced production of indol-3-acetic acid by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on plant growth. In: Ogoshi, A., Kobayashi, L., Homma, Y., Kodama, F., Kondon, N., Akino, S. (Eds.), *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*,
- Bhowmik, S.N. and Singh, C. S. (2004) Mass multiplication of AM inoculum: Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and yeast in rapid culturing of *Glomus mosseae*. *Current Science.* 86, (5): 705-709,
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto, S.** (2001). Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European Journal of Histochemistry* 45: 39-49.
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H.V. and Bonfante, P.** (1996a) An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3005-3010.
- Bianciotto, V., Lumini, E., Lanfranco, L., Minerdi, D., Bonfante, P. and Perotto, S.** (2000). Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *Gigasporaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4503-4509.
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S. and Bonfante, P.** (1996b). Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193:123-131.

- Bloemberg, G. Wijffes, A. H. M. Lamers, G. E. M. Stuurman, N y Lugtenberg B. J. J.** (2000). Simultaneous Imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Populations Expressing Three Different Autofluorescent Proteins in the Rhizosphere: New Perspectives for Studying Microbial Communities. *MPMI* Vol. 13 (11): 1170–1176.
- Boddey, R.M. and Döbereiner, J.** (1988). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant Soil*, 108: 53-65.
- Boddey, R.M., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J.** (1986). Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil* 95:109–121.
- Boddington, C.L. and Dodd, J.C.** (1999). Evidence that differences in phosphate metabolism in mycorrhizas formed by species of *Glomus* and *Gigaspora* might be related to their life-cycle strategies. *New Phytologist* 142: 531–538.
- Boddington, C.L., Bassett, E.E., Jakobsen, I. and Dodd, J.C.** (1999). Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 479-482.
- Bolton, H.J., Fredrickson, J.K., Elliott, L.F.** (1993). Microbial ecology of the rhizosphere. In: *Soil Microbial Ecology*. F.B.J. Metting (ed.): 27-63. Marcel Dekker: New York.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D. and Pharis, R.P.** (1989). Identification of gibberellins A<sub>1</sub> A<sub>3</sub> and iso-A<sub>3</sub> in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90: 45-47.
- Boucher, A., Dalpe, Y. and Charest, C.** (1999). Effect of arbuscular mycorrhizal colonization of four species of *Glomus* on physiological responses of maize. *J. Plant Nutr.* 22(4-5):783-797.
- Bowen, G.D. and Rovira, A.D.** (1999). The rizhosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66:1-102.
- Bremner, E., Jenzen, H., Gilbertson, C.** (1995). Evidence against associative N<sub>2</sub> fixation as a significant source of N in long-term wheat plots. *Plant Soil* 175:13–19.

- Brundrett, M.C., Ashwath, N. and Jasper, D.A.** (1996). Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia I & II. Propagules of mycorrhizal fungi in disturbed habitats. *Plant and Soil* 184: 173-184.
- Budi, S.W., van Tuinen, D., Martinotti, G. and Gianinazzi, S.** (1999). Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5148-5150.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Hampel, M. and Okon, Y.** (1998). Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology* 144: 1989-1999.
- Burns, R. G.** (1982). Enzyme activity in soils: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 14:423-427.
- Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcon-Aguilar, C. and Barea, J.M.** (2004). Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Applied Soil Ecology.* 26 (1): 11-19.
- Carr, G.R. and Hinkley, M.A.,** (1985). Germination and hyphal growth of *Glomus caledonium* on water-agar containing Benomyl. *Soil Biol. Biochem.* 17: 313-316
- Carrillo, A.E., Li, C.Y., and Bashan, Y.** (2002). Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* 89: 428-432.
- Ceccanti, B., Garcia, C.,** (1994). Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances. In: Senesi, N. and Miano, T.M. (Eds.), *Humic Substances In The Global Environment And Implications On Human Health*. Elsevier, Amsterdam. pp. 1279-1284.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chanway, C.P.** (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting rhizobacteria: An emerging technology for reforestation. *For. Sci.* 43: 99-112.

**Clapp, J.P., Helgason, T., Daniell, T. and Young, J.P.W.** (2002). Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Mycorrhizal ecology*, M.G.A. vander Heijden, I. Sanders (eds.) 157: 201-224.

**CLONTECHniques • APRIL 1999.**

**CLONTECHniques • July 2001.**

**Corich, V., Giacomini, A., Concheri, G., Ritzerfeld, B., Vendramin, E., Struffi, P., Basaglia, M., Squartini, A., Casella, S., Nuti, M., Peruch, U., Poggiolini, S., De Troch, P., Vanderleyden, J., Fedi, S., Fenton, A., Moëgne-Loccoz, Y., Dowling, D.N. and O’Gara, F.** (1995). Environmental impact of genetically modified *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* released as soil/seed inoculants. In: Biosafety results of field tests with genetically modified plants and microorganisms. Daniel Jones D (ed): 371-388. Monterey, CA, USA.

**Cornejo P., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. and Ferrol N.** (2004). Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letter* 241: 265-270.

**Costacurta, A. and Vanderleyden, J.** (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1-18.

**Croes, C.L., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J. and Michiels, K.W.** (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2261-2269.

**Daniel K., Jurkevitch, E. and Okon, Y.** (2003). Involvement of the Reserve Material Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6): 3244–3250.

**Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H. and Young, J.P.W.** (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209

**Daniels, B. A., and Menge, J. A.** (1980). Hyperparasitism of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology* 70:584-588.

- Day, J.M and Döbereiner, J.** (1976). Physiological aspects of N<sub>2</sub> fixation by a *Spirillum* from Digitaria roots. *Soil Biol Biochem* 8: 45-50.
- de Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjer, J.B., van der Sluis, I., van Loon, L.C. and Bakker, P.** (2003). Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93: 626-632.
- De Freitas, J.R. and Germida J.J.** (1991). *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 780–784.
- De Freitas, J.R. and Germida, J.J.** (1990). Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 265–272.
- De Troch, P. and Vanderleyden, J.** (1996). Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. *Microb. Ecol.* 32: 149-169.
- Defago, G., Berling, C. H., Burger, U., Haas, D., Kahr, G., Keel, C., Voisard, C., Wirthner, P. and Wthrich, B.** (1992). Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms. In: *Biological control of soil-borne plant pathogens*. D. Homby (ed.): 93-108. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, UK.
- Dekhil, B., Cahill, M., Stackebrandt, E., Sly, L.I.** (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 20:72-77.
- Del Gallo, M. and Fendrik, I.** (1994). The rhizosphere and *Azospirillum*. In: *Azospirillum/Plant Associations*. Y. Okon (ed.): 57- 75. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Di Ciocco, C.A. and Rodriguez-Caceres, E.** (1994). Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine humid pampas. *Field Crop Res.* 37: 253–257.
- Dick, W.A. and Tabatabai, M.A.** (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. In: F.Blaine (Ed.) *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker. New York.

- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R.** (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77, 7347-7351.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y. and Vanderleyden, J.** (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and A-irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biology and Fertility of Soils 36 (4): 284-297.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-González, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, JF., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. and Okon, Y.** (2001). Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust. J. Plant Physiol 28: 1-9.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, and Vanderleyden, J.** (1999). Phytostimulatory effects of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant Soil 212:155-164.
- Döbereiner, J.** (1992). History and new perspectives of diazotrophs in association with nonleguminous plants. Symbiosis 13:1-13.
- Döbereiner, J. and Day, J.M.** (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Vol. 2. W.E. Newton and C.J. Nyman (eds.): 518-538. Washington State University Press, Pullman.
- Döbereiner, J., Baldani, J. and Reis, V.M.,** (1995a). Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms. I. Frenndrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, M. De Zamaroczy (eds.):3-14. Springer, Berlin.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D. and Baldani, J.I.,** (1995b). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas nãoleguminosas. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF.
- Duponnois, R., and C. Plenchette.** (2003). A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. Mycorrhiza 13:85-99.

- Egener, T., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B.** (1998). Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 71-75.
- El-Khawas, H. and Adachi, K.** (1999). Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils* 28 (4): 377–381.
- Elliott, L.F. and Lynch, J.M.** (1995). The international workshop on establishment of microbial inocula in soils: cooperative research project on biological resource management of the organization for economic cooperation and development (OECD). *Am. J. Alter. Agric.* 10: 50-73.
- Fages, J.** (1990). An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 473-478.
- Fages, J.** (1992). An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13: 15-26.
- Fages, J.** (1994). *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: *Azospirillum-Plant associations*. Y. Okon (ed.): 87-110. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Fallik, E. and Okon, Y.** (1996). The response of maize *Zea mays* to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 511–515.
- Fallik, E., Sarig, S. and Okon, Y.** (1994). Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum/Plant Associations*. Y. Okon (ed.): 77-85. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., Bago, B., Franken, P., Gollote, A., Gonzalez-Guerrero, M., Harrier, L., Lanfranco, L., van Tuinen, D. and Gianinazzi-Pearson, V.** (2004a). Genomic of arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Applied mycology & biotechnology. Fungal genomics*. Vol 4. D.K. Arora, G.G. Khachatourians (eds.): 379-403. Amsterdam: Elsevier Science.
- Ferrol, N., Calvente, R., Cano, C., Barea, J.M. and Azcón-Aguilar, C.** (2004b). Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification-threatened semiarid Mediterranean ecosystem *Applied Soil Ecology* 25: 123–133.
- Fitter, A.** (1996). Characteristics and functions of root systems. In: *Plant roots: the hidden half*. Y. Waisel, A. Eshel, U. Kafkafi (eds.): 3-25. 2<sup>nd</sup> edn. Dekker: New York.

- Founoune, H., Duponnois, R., Meyer, J. M., Thioulouse, J., Masse, D., Chotte, J. L. and Neyra, M.** (2002). Interactions between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent pseudomonads on *Acacia holosericea*: isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology* 41:37–46.
- Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J., and Ausubel, F.M.** (1982). Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18: 289-296.
- Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T. and Kapulnik, Y.** (2001). Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiology* 127(4): 1493-1499.
- Garbaye, J.** (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128 (2): 197-210.
- Germida, J.J. and Walley, F.L.** (1996). Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biology and Fertility of Soils* 23 (2): 113-120.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Lherminier, J., Tisserant, B., Franken, P., Dumasgautot, E., Lemoine, M.C., Vantuinen, D. and Gianinazzi, S.** (1995). Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 73: 526-532.
- Giller, K.E. and Day, J.M.** (1985). Nitrogen fixation in the rhizosphere: significance in natural and agricultural systems. In: *Ecological interactions in soil*. A.H. Fitter (ed.):127-147. Blackwell Scientific, Oxford.
- Glick, B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109–117.
- Glick, B.R. and Bashan, Y.** (1997). Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15: 353-378.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., Bücking, H., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y.** (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819-823.
- Gryndler, M.** (2000). Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Y Kapulnick and D.D. Douds Jr.(eds.): 239-262. Kluwer Academic Press.

- Gryndler, M., Hrselova, H., Chvatalova, I. and Jansa, J.** (1998). The effect of selected plant hormones on in vitro proliferation of hyphae of *Glomus fistulosum*. *Biol Plant* 41: 255–263.
- Guillemin, J.P., Orozco, M.O., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S.** (1995). Influence of phosphate fertilization of fungal alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase activities in arbuscular mycorrhiza of soybean and pineapple. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 53: 63–69.
- Guo-Yu, Z., Dobbelaere, S. and Vanderleyden, J.** (2002). Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. *Funct. Plant Biol.* 29:1279-1285.
- Haas, D., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Oberhänsli, T., Schnider, U., Voisard, C., Wüthrich, B., and Défago, G.** (1991). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. I. H. Hennecke and D. P. S. Verma (eds.): 450-456. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hadas, R. and Okon, Y.** (1987) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol Fertil Soils* 5: 241–247.
- Halsall, D.M.** (1993). Inoculation of wheat straw to enhance lignocellulose breakdown and associated nitrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.* 25: 419-429.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Harley, J.L. and S.E. Smith,** (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Nueva York.
- Hartmann, A., Singh, M. and Klingmüller, W.** (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 916-923.
- Hayano, K. and Tubaki, K.** (1985). Origen and properties of  $\beta$ -glucosidases activity of tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 17:553-557.
- Hecht-Buchholz, C.** (1998). The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixation bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonleguminous plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 161: 509-520.

- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schneider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F. and Haas, D.** (2002). Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13: 232-237.
- Helgason, T., Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A. and Young, P.** (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- Helgason, T., Fitter, A.H. and Young, J.P.W.** (1999). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Mol. Ecol.* 8: 659–666.
- Hijri, M. and Sanders, I.R.** (2001). Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745–748.
- Hiltner, L.** (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98: 59-78.
- Isopi R, Fabbri P, Del-Gallo M and Puppi G** 1995 Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis* 18, 43–55.
- Iswaran, V., Sen, A. and Apte, R.** (1972). Plant compost as a substitute for peat for legume inoculants. *Curr. Sci.* 41: 299.
- J. Kevin Vessey.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586,
- Jacoud C, Job D, Wadoux P and Bally R** 1999 Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* 45, 339–342.
- Jacoud, C., Faure, D., Wadoux, P. and Bally, R.** (1998). Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 maize root development by inoculation. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 43–51.
- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P. and Bally, R.** (1999). Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* 45: 339–342.

- Jakobsen, I., Abbott, L.K. and Robson, A.D.,** (1992). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120: 371-380.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. and Robson, A.D.,** (1992). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120: 371-380.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J.M.** (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soil* 37: 1–16.
- Johansson, J.F., Paul, L.R. and Finlay, R.D.** (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1-13.
- Johnson, D., Vandenkoornhuyse, P.J., Leake, J.R., Gilbert, L., Booth, R.E., Grime, J.P., Young, J.P.W. and Read, D.J.** (2004). Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* 161(2): 503-515.
- Joner, E.J. and Johansen, A..** (2000). Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 104:81-86.
- Kaiser, P.** (1995). Diazotrophic mixed cultures of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter cloacae*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden and M. de Zamaroczy (eds.), Vol. G37: 207-212, NATO ASI Series, SeriesG : Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. and Henis, Y.** (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
- Kennedy A.C.** (1998). The rhizosphere and spermosphere. In: Principles and applications of soil microbiology. D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, D.A. Zuberer (eds.): 389-407. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.
- Kennedy A.C. and Smith K.L.** (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Khammas, K.M. and Kaiser, P.** (1992). Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* 38: 794-797.

- Kjoller, R. and Rosendahl, S.** (2000). Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil*: 189-196.
- Kloepper, J. W., Zablutowick, R. M., Tipping, E. M. and Lifshitz, R.** (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D. L. Keister and P. B. Cregan (eds.): 315-326. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Kloepper, J.W.** (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria: other systems. In: *Azospirillum/plant associations*. Y. Okon (ed.): 111-118. CRC Press, Boca Raton.
- Kloepper, J.W.** (1996). Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience* 46: 406-409
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N.** (1981). Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71: 642-644.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablutowicz, R.M.** (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39-43.
- Koch, AM., Kuhn, G., Fontanillas, P., Fumagalli, L., Goudet, I., Sanders, I.R.** (2004). High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (8): 2369-2374.
- Kowalchuk, G.A., de Souza, F.A. and van Veen, J.A.** (2002). Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol. Ecol.* 11: 571–581.
- Lebuhn, M. and Hartmann, A.** (1994). Production of auxin and ltryptophan related indolic and phenolic compounds by *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. In: *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen (eds.): 145-147. CSIRO, Australia.
- Lebuhn, M., Heulin, T. and Hartmann, A.** (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenobacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 325-334.

- Lethbridge, G., Davidson, M.S., Sparling, G.P.** (1982). Critical evaluation of the acetylene reduction test for estimating the activity of nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of wheat and barley. *Soil Biol Biochem* 14:27–35.
- Linderman, R. G.** (1992). VA mycorrhizae and soil microbial interactions. In: *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. G.J. Bethelenfalvay, R.G. Linderman (Eds.): 45-70. ASA Special Publication 54, Madison, WI, USA.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, B.** (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Lugtenberg, B.J.J., Weger de, L. A. and Bennett, J. W.** (1991). Microbial stimulation of plant growth and protection from disease, *Current opinion in Microbiology* 2: 457-464.
- Lugtenberg, B.J.J. and Dekkers, L.C.** (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiolog.* 1:9-13.
- Lum, M.R. and Hirsch, A.M.** (2003). Roots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 368-382.
- Lynch, J.M.** (1990). *The Rhizosphere*. John Wiley (Ed.):258. New York.
- Macdonald, R.M.** (1989). An overview of crop inoculation. In: *Microbial inoculation of crop plants*. R. Campbell, R.M. Macdonald (eds.): 1-9. Special publication of the society of general microbiology, vol. 25. IRL Press, Oxford, New York.
- Magurran, A.** (1988). *Diversidad Ecológica y su Medición*. Ediciones Vedra S.A.
- Mamatha, G., D. J. Bagyaraj, and S. Jaganath.** (2002). Inoculation of field-established mulberry and papaya with arbuscular mycorrhizal fungi and a mycorrhiza helper bacterium. *Mycorrhiza* 12:313–316.
- Matz, M.M.V., Fradkov, A.F., Labas Y.A., Savitsky, A.P. Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. and Lukyanov, S.A.** (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology* 17:969-973.
- Menze, H.** (1985). Wechselwirkungen zwischen *Azospirillum* und VA-Mycorrhiza mit Gramineen bei verschiedenen Boden-ph-Werten. *Journal Agron. Crop. Sci.* 155:232.

- Michiels, K.W., Croes, C.L. and Vanderleyden, J.** (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2241-2246.
- Mohammadi, O.** (1994a). Commercial development of Mycostop biofungicide. In *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen (eds.): 282-284. Division of Soils CSIRO, Adalaide, Australia.
- Mohammadi, O.** (1994b). Lecture in 3<sup>rd</sup> international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria. Adelaide, South Australia.
- Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H. and Saud, H. M.** (2001). Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable Soybean by *Azospirillum*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32: 2177-2187.
- Morrissey, J.P., Walsh, U.F., O'Donnell, A., Moenne-Loccoz, Y. and O'Gara, F.** (2002). Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 599-606.
- Morton, J.B. and Benny, G.L.** (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae, with an emendation of glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Mummey, D.L., Rillig, M.C. and Holben, W.E.** (2005). Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhiza fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant and Soil* 271: 83-90.
- Munkvold, L., Kjoller, R., Vestberg, M., Rosendahl, S. and Jakobsen, I.** (2004). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 164, 357–364.
- Nannipieri, P., Grego, S. and Ceccanti, B.** (1990). Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 293-355.
- Negi, M., Sachdev, M.S., Tilak, K.V.B.R.** (1990). Influence of soluble phosphorus fertilizer on the interaction between a vesiculararbuscular mycorrhizal fungus and *Azospirillum brasilense* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biol Fertil Soils* 10:57–60.
- Newman El** (1966). A method of estimating the total length of root in a sample. *J Appl Ecol.* 3: 139–145.

- Nicholas, D.J.D.** (1965). Influence of the rhizosphere on the mineral nutrition of the plant. In: Ecology of soil-borne plant pathogens. K.F. Baker, W.C. Snyder (eds): 210-217. University of California Press, Berkeley.
- Nobbe, F. and Hiltner, L.** (1896). U.S. Patent 570 813. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.
- O'Gara F., Dowling, D.N., Boesten, B.** (1994). Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. Weinheim, Germany: VCH, 173.
- Okon, Y.** (1985). *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends Biotechnol. 3: 223–228.
- Okon, Y. and Kapulnik, Y.** (1986). Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant Soil 90: 3-16.
- Okon, Y. and Labandera-Gonzalez, C.** (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. Vol 26 (12):1591-1601.
- Okon, Y. and Vanderleyden, J.** (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News 63: 366-370.
- Okon, Y., Kapulnik Y. and Sarig, S.** (1988). Field inoculation studies with *Azospirillum* in Israel. In: Biological Nitrogen Fixation Recent Developments. Subba Rao N.S. (ed.):175-195. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi, India.
- Ona, O., Impe, J.V., Prinsen, E. and Vanderleyden, J.** (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. FEMS Microbiology Letters 246: 125–132
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., Koljalg, U., Zobel, M. and Sen, R.** (2003). Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. New Phytologist 160 (3): 581-593.
- Pacovski, R. S.** (1989a). Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition, p. 235–239. In F. A. Skinner, R. M. Bodden, and I. Fendrik (ed.), Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. (Capitulo 7)

- Pacovsky, R.S.** (1989b). Metabolic differences in *Zea-Glomus-Azospirillum*-symbioses, *Soil Biol. Biochem.*21:953. (Cápitulo 1)
- Patriquin, D.G., Döbereiner, J. and Jain, D.K.** (1983). Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900-915.
- Persello-Cartieaux F., Nussaume, L. and Robaglia, C.** (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell and Environment* 26: 189-199.
- Prasher, D.C., Echenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J.** (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J. and Van Onckelen, H.** (1993). *Azospirillum* brasilense indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 609-615.
- Probanaza, A., Lucas, G.J.A., Ruiz, P.M., Ramos, B., and Gutierrez, M.F.J.** (2002). *Pinus pinea* L. seedling 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.
- Ramos, H.J.O., Roncato-Maccari, L.D.B., Souza, E.M., Soares-Ramos, J.R.L., Hungria, M. and Pedrosa, F.O.** (2002). Monitoring *Azospirillum* wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology* 97: 243–252.
- Ramos, H.J.O., Roncato-Maccari, L.D.B., Souza, E.M., Soares-Ramos, J.R.L., Hungria, M. and Pedrosa, F.O.** (2002). Monitoring *Azospirillum* wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology* 97: 243–252.
- Ravnskov, S., Nybroe, O. and Jakobson, I.** (1999). Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus on *Pseudomonas fluorescens* DF57 in rhizosphere and hyphosphere soil. *New Phytologist* 142: 113-122.
- Redecker, D.** (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10, 73-80.
- Redecker, D., Kodner, R. and Graham, L.E.** (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.

- Redecker, D., Morton, J.B. and Bruns, T.D.** (2000). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol 14: 276-284.
- Reynders, L. and Vlassak, K.** (1979). Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem* 11: 547-548.
- Rillig, M.C., Wright, S.F. and Eviner, V.T.** (2002). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plants species. *Plant and Soil* 238:325-333.
- Rodríguez, A., Clapp, J.P. and Dodd, J.C.** (2004). Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Journal of Ecology* 92: 986-989.
- Rubenchik, L.I.** (1963). *Azotobacter* and its use in agriculture. Academy of sciences of the Ukrainian SSR, Microbiological Institute D.K. Zabolotnyi. Israel programme for scientific translations, Jerusalem. 65 p. (from a Russian text published in 1960).
- Ruiz-Lozano, J.M. and Azcon, R.** (1993). Specificity and functional compatibility of VA mycorrhizal endophytes in association with *Bradyrhizobium* strains in *Cicer arietimon*. *Symbiosis* 15: 217-226.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. and Gomez, M.** (1995). Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 456-460.
- Ruiz-Lozano, J.M., Collados, C., Barea, J.M.** (2001). Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytologist* 151 (2): 493-502.
- Ruiz-Lozano, J.M., Gómez, M. and Azcón, R.** (1995). Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological plant responses of lettuce to progressive drought stress periods *Plant Science* 110 (1):37-44
- Russo, A., Felici C., Toffanin, A., Götz, M., Collados, C., Barea, J.M., Moënné-Loccoz, Y., Smalla, K., Vanderleyden, J. and Nuti, M.** (2005). Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants *Biology Fertility of Soils* 41(5): 301–309.

- Saito, M., Stribley, D.P. and Hepper, C.M.** (1993). Succinate dehydrogenase activity of external and internal hyphae of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdmann and Trappe, during mycorrhizal colonization of roots of leek (*Allium-Porrum* L.), as revealed by in situ histochemical staining. *Mycorrhiza* 4: 59–62.
- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. and Wiemken, A.** (1995). Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.* 130: 419–427.
- Sarig, S., Blum, A. and Okon, Y.** (1988). Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Journal Agric. Sci.* 110:271–277.
- Schippers, B.** (1992). Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. In: *Biological control of plant diseases, progress and challenges for the future.* E. C. Tjamos, G. C. Papavizas and R. J. Cook (eds). Plenum Publishing Corp. N.Y.
- Schippers, B., Bakker, A.W. and Bakker, P.A.H.M.** (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathology* 25: 339-358.
- Schüßler, A., Gehrig, H., Schwarzott, D. and Walker, C.** (2001a). Analysis of partial Glomerales SSU rRNA genes: implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* 105: 5-15.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. and Walker, C.** (2001b). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105 (12):1413-1421.
- Skvortsov, I.M. and Ignatov, V.V.** (1998). Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiology Letters* 165: 223-229.
- Smith, R.S.** (1992). Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbial.* 38: 485- 492.
- Smith, R.S.** (1995). Inoculant formulations and applications to meet changing needs. *Zn Nitrogen fixation: fundamentals and applications.* I. A. Tiionovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Newton (eds): 653-657. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Smith, S.E. and Dickson, S.** (1991). Quantification of active vesicular-arbuscular mycorrhizal infection using image analysis and other techniques. *Australian Journal of Plant Physiology*. 18: 637-648.
- Smith, S.E. and Read, D.J.** (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego. Academic Press.
- Söderberg, K.H., Olsson, P.A. and Baath, E.** (2002). Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology* 40:223-231.
- Stahl, P.D., Christensen, M. and Williams, S.E.** (1990). Population variation in the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: uniform garden experiments. *Mycol Res* 94:1070–1076.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. and Napoli, C.** (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* 169: 5789-5794.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J.** (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506.
- Stoltzfus, J.R., Jansson, J.K. and Bruijn, F.J.** (2000). Using green fluorescent protein (GFP) as a biomarker or bioreporter for bacteria. In: *Tracking genetically-engineered microorganisms*. J.K. Jansson, J.D. can Elsas and M.J. Bailey (eds.):101-106. Landes Bioscience:Georgetown, TX.
- Strzelczyk, F., Kampert, M., and Li, C.Y.** (1994). Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol Res* 149:55–60.
- Subba Rao, N.S., Tilak, K.V.B.R. and Singh, C.S.** (1985). Effects of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant Soil* 84:283–286.
- Sylvia, D.M. and Williams, S.E.** (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. In: *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. G.J. Bethlenfalvay and R.G. Linderman (eds.):101-124. American Society of Agronomy, Madison, WI.

- Sylvia, D.M. and Williams, S.E.** (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. In: *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. G.J. Bethlenfalvay and R.G. Linderman (eds.):101-124. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Tang, W.H.** (1994). Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. In: *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen (eds.): 267-273. Division of Soils CSIRO, Adalaide, Australia.
- Tang, W.H. and Yang, H.** (1997). Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects*, A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds.): 4-9. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Thuler, D.S., Floh, E.I., Handro, W. and Barbosa, H.R.** (2003). Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp in chemically defined media. *Lett Appl Microbiol.*37(2):174-178.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H. and Hubbell, D.H.** (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Applied Environmental Microbiology* 37:1016–1024.
- Tisdall, J.M., and Oades, J.M.** (1979). Stabilization of soil aggregates by the root systems of rye grass. *Aust. Journal Soil Res.* 17 : 429-441.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. and Golotte, A.** (1993). In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* 97: 245–250.
- Toljander, J.F., Artursson, V., Paul, L.R., Jansson, J.K., and Finlay, R.D.** (2006) Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Letters* 254(1): 34-40.
- Toro, M., Azcón, R. and Barea, J.M.** (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (<sup>32</sup>P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4408-4412.

- Tran Van, V., Berge, O., Ngo Ke, S., Balandreau, J. and Heulin, T.** (2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 281: 273–284.
- Trevors, J.T., van Elsas, J.D., Lee, H. and van Overbeek, L.S.** (1992). Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microb. Releases* 1: 61-69.
- Trouvelot, D., van Tuinen, D., Hijri, M. and Gianinazzi-Pearson, V.** (1999). Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8: 203–206.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67:509-544.
- Van Aarle, I. M., Cavagnaro, T. R., Smith, S. E., Smith, F. A. and Dickson, S.** (2005). Metabolic activity of *Glomus intraradices* In *Arum*- and *Paris*-type arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist*. 166: 611–618.
- Van Aarle, I. M., Olsson, P. A. and Söderström, B.** (2001). Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia* 93: 17–24.
- Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P. and Vanderleyden, J.** (1999). Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Molecular Microbiology* 32(4): 703-714.
- Van der Heijden, M.G.A.** (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology Letters* 7: 293-303.
- Van Elsas, J.D., Kijkstra, A.F., Govaert, J.M. and van Veen, J.A.** (1986). Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 151-160.
- Van Loon, L.C., Bakker, P. and Pieterse, C.M.J.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483.
- Van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. and Gianinazzi-Pearson, V.** (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25 S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*: 879-887.

- Vande Broek, A. and Vanderleyden, J.** (1995). Review: genetics of the *Azospirillum*- plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14:445–466.
- Vande Broek, A. and Vanderleyden, J.** (1995a). The Role of Bacterial Motility, Chemotaxis, and Attachment in Bacteria-Plant Interactions. *MPMI* 8 (6): 800-810.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M. and Vanderleyden, J.** (1998). Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 144: 2599-2606.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., Vanderleyden, J. Auxins** (1999). Upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 181: 1338-1342.
- Vande Broek, A., Michiels, J., Van Gool, A. P., and Vanderleyden, J.** (1993). Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 592-600.
- Vandenkoornhuyse, P., Ridgway, K.P., Watson, I.J., Fitter, A.H. and Young, J.P.W.** (2003). Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12(11): 3085-3095.
- Vanstockem, M., Michiels, K. and Vanderleyden, J.** (1987). Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: physical analysis of Tn5 and Tn5-mob insertion mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 410-415.
- Vázquez, M. M., César S., Azcón R. and Barea, J.M.** (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology.* 15: (3) 261-272.
- Vierheilig, H. and Piché, Y.** (2002). Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses, In: *Flavonoids in Cell Functions*. B. Buslig and J. Manthey (eds.): 23-39. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Villegas, J. and Fortin, J.A.** (2002). Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO<sub>3</sub> - as nitrogen source. *Can. J. Bot.* 80:571-576.

- Vivas, A., Azcon, A., Biro, B., Barea, J.M. and Ruiz-Lozano, J.M.** (2003a). Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 10.
- Vivas, A., Voros, A., Biro, B., Barea, J.M., Ruiz-Lozano, J.M. and Azcón, R.** (2003b). Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp in improving plant tolerance to Cd contamination. *Applied Soil Ecology* 24(2):177-186.
- Walley, F. J. and Germida, J. J.** (1996). Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza* 6:43-49.
- Weber, O.B., Baldani, V.L.D., Teixeira, K.R.S., Kirchhof, G., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** (1999). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil.*, 210:103-213.
- Weller, D.M. and Thomashow, L.S.** (1994). Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms biotechnology and the release of GMOs.* O'Gara F, Dowling DN, Boesten B, Winheim VCH (eds): 1-18. Germany.
- Weller, M.D. and Cook, R. J.** (1986). Increased growth of wheat by seed treatment with *Pseudomonas* and implication of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 328-334.
- Wöhler, I.** (1997). Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiological Research* 152: 399-405.
- Xavier, L.J.C. and Germida, J.J.** (2003). Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biol. Biochem.* 35: 471-478.
- Yoshino, K., Nishigaki, K. and Husimi, Y.** (1991). Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucl. Acids Res.* 19: 3153.
- Zahir, Z.A., Arshad, M. and Frankenberger, W.T.** (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: Applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81: 97-168.

**Zakharova, E.A., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.S. and Ignatov, V.V.** (1999). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: Insights from quantum chemistry. Eur J Biochem 259: 572-576.

