



TESIS DOCTORAL

“Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) en Andalucía”

SERGIO ARANDA OCAMPO

DIRECTORA: Dra. BLANCA B. LANDA DEL CASTILLO

Córdoba, Noviembre de 2010

TITULO: *Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (Olea europaea L. subsp. europaea) en Andalucía*

AUTOR: *Sergio Aranda Ocampo*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-694-1643-3



“Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) en Andalucía”

Memoria redactada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba, por el Licenciado en Biología:

Sergio Aranda Ocampo

Visto Bueno:

La Directora de la Tesis

El Tutor de la Tesis

Dra. Blanca B. Landa del Castillo
Investigadora Científica
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

Prof. Dr. Rafael M. Jiménez Díaz
Catedrático de Patología Vegetal
Universidad de Córdoba

Córdoba, Noviembre de 2010

Dña. **BLANCA B. LANDA DEL CASTILLO**, Investigadora Científica del Departamento de Protección de Cultivos, del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC.

INFORMA: Que el trabajo **“Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) en Andalucía”**, que ha llevado a cabo el Licenciado en Biología D. Sergio Aranda Ocampo bajo mi dirección, lo considero ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Noviembre de 2010

Dra. Blanca B. Landa del Castillo
Investigadora Científica
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

D. **RAFAEL M. JIMÉNEZ DÍAZ**, Catedrático de Patología Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba

INFORMAN: Que el trabajo **“Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) en Andalucía”**, que ha llevado a cabo el Licenciado en Biología D. Sergio Aranda Ocampo bajo la dirección de la Dra. Blanca B. Landa del Castillo, Investigadora Científica del Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, y que ha sido realizada bajo mi tutoría puede ser presentada para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Noviembre de 2010

Prof. Dr. Rafael M. Jiménez Díaz
Catedrático de Patología Vegetal
Universidad de Córdoba



Este Trabajo ha sido realizado en el Grupo PAIDI AGR 136 ‘Sanidad Vegetal’ del Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, gracias a la concesión de una beca de Postgrado del Programa de Formación y Fortalecimiento de Investigadores del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y con el respaldo del Colegio de Postgraduados de Ciencias Agrícolas como parte del Programa de Formación de Profesores de México Iber, S.A. a D. Sergio Aranda Ocampo. Los Proyectos de Investigación AGL2008-00344 **“Effect of olive management systems on biological fertility and phytosanitary status of olive orchards soils as determined by biological and functional diversity of the rhizosphere ecosystem”** financiado por el ‘Ministerio de Ciencia e Innovación’ de España y el Fondo Social Europeo y **“Cambios en la diversidad genética y patogénica de poblaciones de hongos fitopatógenos causantes de Marchiteces Vasculares y de la microflora rizosférica asociados al uso de genotipos de la planta huésped que difieren en resistencia a la enfermedad”** el Proyecto Intramural PI2007-40I012 del CSIC, han financiado la realización del mismo.

Córdoba, Noviembre de 2010

Para Adriana y Laura, mi familia y las dos mujeres más importantes en mi vida, por ser la fuerza que todo lo impulsa, por acompañarme en esta tarea y crecer juntos, por no desistir y permanecer siempre a mi lado con su apoyo, compañía y alcanzar juntos nuestros objetivos

A mis Padres, a quienes les debo todo lo que soy

A mis Hermanos, por estar siempre pendientes, gracias por estar aquí siempre conmigo, aún cuando físicamente nos separen miles de kilómetros

A la memoria de mi Padre, quién por siempre vivirá en mí y estará conmigo, en cada acción, en cada gesto, en cada palabra, en cada enseñanza a mi hija. Gracias papá por todo lo que me has dado, gracias por inculcarme siempre el deseo de superarme

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas en México, por la confianza depositada en mí, por todo su apoyo brindado en todo momento para realizar mis estudios de Doctorado y permitirme crecer profesionalmente.

A mi directora de Tesis Doctoral, Dra. Blanca B. Landa del Castillo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su dirección, por su orientación y consejos tanto en lo académico como en lo personal, por escucharme y darme siempre una palabra reconfortante en los momentos más difíciles; por su empeño y dedicación en culminar este trabajo de investigación.

Al Prof. Dr. Rafael M. Jiménez Díaz con quien establecí el primer contacto, por su pasión por la Fitopatología y gran disposición en integrarme a su grupo de investigación y permitirme iniciar esta gran experiencia.

A los Drs. Juan Antonio Navas Cortés y Pablo Castillo Castillo, por todas sus atenciones, apoyo y enseñanzas; por estar siempre incondicionalmente dispuestos a atender cualquier necesidad tanto académica, material como personal.

Al Dr. Miguel Montes Borrego, por su invaluable ayuda en la organización de la información, por todas sus observaciones y apoyo constante.

A Fran y Guillermo, por dedicar parte de su tiempo en este trabajo de investigación.

A todos ellos: Efrén, Dani, Conchi, Gemma, Victor, Salva, Carolina, Carlos Lucena, Carlos Gutiérrez, José Luis, Juanma, Jorge, Juan Emilio, Rocío y todas aquellas personas que han estado en algún momento en el grupo de Sanidad Vegetal, con quienes he compartido estos años múltiples experiencias, por haberme dado la confianza de interactuar con ellos, por ser más mis amigos que compañeros de trabajo. A todos ellos, gracias por todo.

BIOGRAFÍA

Sergio Aranda Ocampo nació en Amacuzac, Morelos, México el 23 de Julio de 1968. Realizó sus estudios básicos en la Escuela Secundaria Técnica 3 y posteriormente en la Escuela Preparatoria 5 de Puente de Ixtla Morelos donde en el último año de estudios, elige seguir la línea de formación en Ciencias Biológicas, particularmente en el ámbito agrícola.

En Enero de 1986 inició sus estudios de Biología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en Cuernavaca (Morelos), obteniendo el Título de Licenciado en Biología en el año 1991 tras defender su Tesis profesional “Evaluación de fungicidas contra la “mancha negra” del nardo (*Polianthes tuberosa* L.) causado por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz en la región de Tequesquitengo, Morelos”. Durante el desarrollo de la investigación de Tesis, realiza la mayor parte de esta en el laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP) de la región centro en Zacatepec Morelos; periodo en el cual se involucra y se interesa aún más por la fitopatología.

En el año de 1992, realiza sus estudios de Maestría en el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas mediante la obtención de una beca por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), obteniendo el grado de Maestro en Ciencias en el año de 1995 tras defender la Tesis de investigación “Evaluación de *Bacillus subtilis* como agente de control biológico en el cultivo de patata (*Solanum tuberosum* L.)”

Al finalizar sus estudios de Maestría, es invitado a ingresar como Investigador en el Instituto de Fitosanidad, anteriormente Centro de Fitopatología donde se desarrolla como investigador en el área de Bacterias Fitopatógenas llevando a cabo

actividades de investigación enfocadas principalmente en el diagnóstico y manejo de enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas, además de participar en diversos proyectos de investigación relacionados con el sector productivo; actividad profesional que hasta la actualidad sigue desempeñando.

En el año 2006, le fue concedida una beca como parte de un programa de formación y fortalecimiento de investigadores por parte del CONACYT y con el respaldo del Colegio de Postgraduados como parte del Programa de Formación de Profesores para iniciar sus estudios de Doctorado en la Universidad de Córdoba, España, realizando la investigación de Tesis Doctoral sobre Ecología Microbiana en el grupo de investigación AGR-136 Sanidad Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) ha sido culturalmente y económicamente el principal cultivo oleaginoso de la Cuenca Mediterránea. España es el mayor productor de aceite de oliva en el mundo, y Andalucía, la región sur del país, es el principal área de cultivo con 62% de la superficie de olivar en España, ocupando >1.5 millones ha, 17% de la superficie total de la región en un monocultivo impresionante. En España, el olivo se puede encontrar en dos formas, silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y cultivada (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*). Las interacciones planta-microorganismo en la rizosfera y endosfera ha sido objeto de considerables estudios, ya que las comunidades bacterianas desempeñan un importante papel en el balance, desarrollo y funcionamiento del ecosistema suelo en diferentes sistemas agrícolas en muchas especies de plantas cultivadas. Esta Tesis Doctoral, se ha centrado en el estudio de la estructura y diversidad genética de las comunidades bacterianas de la rizosfera de olivos cultivados y silvestres en Andalucía, determinando el papel que los sistemas de manejo del suelo y los factores asociados a la planta pueden tener sobre éstas.

En España, recientemente se han introducido métodos alternativos del manejo del suelo para reducir al mínimo la vulnerabilidad de los olivares a la erosión del suelo, uno de los principales problemas para la sostenibilidad del olivo en Andalucía, incluyendo el no-laboreo combinado con el control mecánico de malas hierbas, laboreo reducido con y sin control de malas hierbas y siembra de cubiertas vegetales en el otoño y eliminación de malas hierbas con herbicidas en la primavera y/o posterior desbroce o pastoreo. En este trabajo, se utilizó el análisis FT-RFLP (Análisis del Polimorfismos de Longitud del Fragmento de Restricción Terminal Fluorescente) de las secuencias amplificadas de la región 16S del ADNr para estudiar las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas en muestras de suelo de 46 plantaciones comerciales de olivo orgánico y 12 áreas naturales cercanas con diferentes tipos de suelo. Las fincas de olivar estudiadas han estado sometidas a los diferentes sistemas de manejo de suelo durante largo tiempo en dos de las zonas más representativas para el cultivo de olivar en la región de Andalucía, y representan ejemplos de sistemas agroforestales y plantaciones

tradicionales. Nuestros resultados demostraron que dentro de cada finca de olivar tanto el tipo de suelo como el manejo de éste contribuyeron en este orden a modificar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas de acuerdo a los valores de los índices de Riqueza y Shannon Weiner. Los suelos de olivar de *Sierra Morena* con laboreo ligero o pastoreo con ovejas durante todo el año, presentaron mayores valores de estos índices de diversidad comparados con todos los sistemas de manejo del suelo en *Campaña* (laboreo convencional y cobertura del suelo con desbroce). Mediante este análisis FT-RFLP algunos fragmentos de restricción terminal han sido identificados y asociados significativamente a sistemas de manejo de suelo específicos, los cuales podrían ser utilizados en el futuro como indicadores para evaluar el efecto de cambios en el manejo de suelo en la modificación de las propiedades biológicas del suelo incluyendo la calidad biológica del mismo.

Entre los árboles cultivados y silvestres, el olivo es una de las especies de mayor longevidad y riqueza en variabilidad genética. En España, más de 200 variedades son actualmente cultivadas. En Andalucía ocho cultivares de olivo (Hojiblanca, Lechín de Sevilla, Manzanilla de Sevilla, Nevadillo Negro, Picual, Picudo, y Verdial de Huévar) representan >90% del área total cultivada, y nuevos cultivares (Arbequina y Frantoio) están siendo actualmente introducidos. En esta Tesis Doctoral, utilizando un enfoque tanto cultivo-dependiente e independiente (FT-RFLP de las secuencias amplificadas de la región 16S ADNr), evaluamos la influencia específica del genotipo de olivo, vivero de origen de los plantones, y el tiempo de incubación en la estructura de las comunidades bacterianas así como en las comunidades bacterianas cultivables totales (BCT) y *Pseudomonas fluorescentes* (Ps) en la rizosfera y endosfera de seis cultivares (Arbequina, Frantoio, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Picual, y Picudo). Nuestros resultados indicaron que en primer lugar el vivero de origen, y en segundo lugar el genotipo del olivo, tuvieron una influencia significativa en la estructura de las comunidades iniciales y densidad de población de bacterias cultivables en la rizosfera y endosfera. En general, los cultivares Arbequina y Frantoio mostraron los mayores niveles de densidad de población. Asimismo, la estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera de seis cultivares de olivo muestreados en distintos tiempos de crecimiento fueron diferenciados en primer lugar en función del tiempo de

muestreo y en segundo lugar en función del genotipo del olivo, con densidad de poblaciones de BCT y Ps manteniéndose estables o incrementando sus niveles de densidad de población.

En esta Tesis Doctoral, nuestra hipótesis fue que ambas formas de olivo, cultivada y silvestre, pueden ser una importante fuente de variabilidad genética la cual puede contener comunidades bacterianas en la rizosfera con importantes aplicaciones en la medicina, veterinaria, agricultura o industria. Mediante un enfoque de análisis polifásico, examinamos la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en la rizosfera de olivos silvestres en Andalucía. Primero, utilizando la técnica de análisis FT-RFLP de la región 16S ADN_r, encontramos una alta heterogeneidad en la composición de las comunidades bacterianas de la rizosfera, sugiriendo la existencia de comunidades específicas en función del genotipo de la planta y localización geográfica, siendo cada reducto de acebuche un reservorio único de diversidad. Posteriormente, investigamos el potencial antagonista de esas poblaciones bacterianas cultivables asociadas a la raíz. De un total de 675 aislados bacterianos de la rizosfera y endosfera de olivos silvestres, 94 (14%) mostraron una fuerte actividad antagonista *in vitro* contra *V. dahliae* patotipo defoliante, el cual es considerado uno de los más importantes patógenos que afectan al cultivo del olivo en el mundo. La proporción más alta de antagonistas se obtuvo de la rizosfera (59,6%) en comparación con la endosfera (40,4%). En total, la mayoría de los antagonistas (entre un 58,5 a 78,3%), mostraron actividad proteolítica, lipolítica, quitinolítica, produjeron ácido indol-acético y sideróforos. Mediante la secuenciación del gen 16S del ADN_r, los antagonistas se identificaron indicando que la mayoría de las bacterias pertenecen al género *Bacillus* (56,4%), *Pseudomonas* (27,7%) y *Paenibacillus* (7,4%). Asimismo, varios de los aislados bacterianos que se identificaron no habían sido previamente citados en olivo incluyendo *Acinetobacter* sp. (3,2%), *Chryseobacterium vyrstaatense* (2,1%), *Rhodococcus wratislaviensis* (1,1%), y *Rahnella* sp. (1,1%). En general, varias de estas bacterias mostraron un alto y gran número de mecanismos de antagonismo, por lo que deben ser considerados para futuros análisis como potenciales agentes de biocontrol contra *V. dahliae* en olivo.

Finalmente, realizamos un intenso estudio enfocado en nuevas *Duganella* spp. de pigmentación morada productoras de violaceína con interés biotecnológico habitando la rizosfera de olivos silvestres y cultivados en el sur de España. Mediante una caracterización fisiológica y bioquímica, análisis filogenético de diferentes genes incluyendo 16S ADNr, *gyrB* y *vioA* (implicado en la síntesis de violaceína), aislamos e identificamos por primera vez *Duganella* spp. asociadas con la rizosfera de plantas leñosas en medio ambientes de clima Mediterráneos que son capaces de producir violaceína, un metabolito secundario de color azul-morado con importantes aplicaciones biológicas, médicas e industriales de alto interés biotecnológico. Las siete cepas de *Duganella* spp. estudiadas pudieron ser identificadas como dos potenciales especies nuevas y fueron diferenciadas de acuerdo a su huésped de origen (*Duganella baetica* en olivos silvestres versus *Duganella olivae* en olivos cultivados). Todas las cepas de *Duganella* spp. produjeron violaceína *in vitro*, con niveles de producción natural más altos (hasta X65) que los citados en la literatura para cepas de otras especies bacterianas productoras de violaceína. Este alto rendimiento, hacen de estas bacterias buenas candidatas para su explotación biotecnológica, ya que los bajos rendimientos en la producción de violaceína se consideran una de las principales limitaciones de las cepas silvestres para su producción masiva y explotación comercial. Aunque no se demostró actividad inhibidora *in vitro* frente a bacterias gram-negativas y hongos fitopatógenos, el filtrado crudo de violaceína si demostró actividad inhibidora contra bacterias gram positivas. También observamos que las cepas de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados mostraron actividad proteolítica y lipolítica y una débil producción de sideróforos lo cual merece una investigación más extensa como potenciales inoculantes de plantones de olivo para mejorar su crecimiento y el establecimiento y supresión de patógenos del suelo.

SUMMARY

The olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) has been culturally and economically the main oleaginous crop in the Mediterranean Basin. Spain is the largest olive oil producer in the world, and Andalusia, its southernmost region, is the main olive-growing area with 62% of the Spanish cultivated area, occupying >1.5 million ha, 17% of the total surface area of the region, in an impressive monoculture. In Spain, olive can be found in two forms, namely cultivated (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) and wild (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Plant-microbe interactions in the rhizosphere and endosphere have been the subject of considerable studies since bacterial communities play an important role in the balance, development and soil ecosystem functioning in different agricultural systems in many species of cultivated plants. This PhD Thesis has focused on the study of the structure and genetic diversity of bacterial communities in the rhizosphere of wild and cultivated olives in Andalusia, determining the role that soil management systems and plant-associated factors may have on it.

In Spain, alternative soil management methods have been recently introduced to minimize vulnerability of olive orchards to soil erosion, one of the problem for olive sustainability in Andalusia, including non-tillage combined with mechanical weed control, reduced tillage with or without weed control, and a cover crop sown in the autumn and killed with herbicides in the spring and/or subsequently mowed or grazed. In this work, FT-RFLP (Fluorescent Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) analyses of amplified 16S rDNA were used to study differences in bacterial community structure in soil samples taken from 46 organic commercial olive groves and 12 natural areas nearby with different soil types. Those studied olive orchards have experienced different soil management systems for long-term in two of the most representative areas for olive cultivation in Andalusia region, representing examples of agroforestry stands and traditional groves. Our results demonstrated that within each soil orchard both, the soil type and soil management systems contributed in that order to modify bacterial community structure and diversity as determined by the Richness and Shannon index. Olive soils in *Sierra Morena* with light tillage or sheep grazing all year presented higher values of those diversity statistics as

compared to all soil management systems in *Campiña* (Conventional tillage and use of cover crops with mowing). This FT-RFLP analysis as well as some terminal restriction fragments that have been identified significantly associated to specific soil management systems can be exploited in the future as indicators to assess the effect of changes in soil management in the modification of soil biological properties included in soil biological quality.

Among cultivated and wild trees, olive is one of the species of larger longevity and richest in genetic biodiversity. In Spain over 200 olive varieties are currently cultivated. In Andalucía, eight olive cultivars (Hojiblanca, Lechín de Sevilla, Manzanilla de Sevilla, Nevadillo Negro, Picual, Picudo, and Verdial de Huévar) account for >90% of total cropped area, and new cultivars (Arbequina and Frantoio) are currently being introduced. In this PhD Thesis, by using both culture-dependent and independent (FT-RFLP analysis of 16S rDNA) approaches, we evaluated the selective influence of olive genotype, nursery of origin of the olive planting stocks, and incubation time on bacterial community structure as well as on total cultivable bacterial communities (TBC) and fluorescent *Pseudomonas* (Ps) in the rhizosphere and endosphere of six cultivars (Arbequina, Frantoio, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Picual, and Picudo). Our results showed that the nursery of origin, primarily, and the olive genotype, secondly, had a significant influence on the initial community structure and population density of cultivable bacteria in the rhizosphere and endosphere. In general, Arbequina and Frantoio cultivars showed the highest population density levels. Also, rhizosphere bacterial community structure of six olive cultivars sampled at different times of growth were differentiated primarily on the basis of the sampling time and secondly based on the olive genotype, with population densities of TBC and Ps maintaining stable or increasing their population density levels.

In this PhD Thesis we hypothesized that the two forms of olive trees, cultivated and wild, may be an important source of genetic variability which may contain rhizosphere bacterial communities of important application in medicine, veterinary, agriculture or industry. By using a polyphasic approach, we examined the structure and diversity of bacterial communities in the rhizosphere of wild olives in Andalusia. First, using FT-RFLP analysis of amplified 16S rDNA sequences, we found a high heterogeneity of rhizosphere bacterial community

composition, suggesting the existence of plant genotype-site-specific communities, with each oleaster haven being a unique reservoir of bacterial diversity. Thereafter, we investigated the antagonistic potential of these cultivable root-associated bacterial populations. From a total of 675 isolated bacteria from the rhizosphere and endosphere of wild olives, 94 (14%) showed a strong *in vitro* antagonistic activity against *Verticillium dahliae* defoliating pathotype, which is considered one of the most important and most serious pathogens affecting olive crops worldwide. A higher proportion of antagonists were obtained from the rhizosphere (59.6%) as compared to the endosphere (40.4%). Most of the bacterial antagonists (from 58.5 to 78.3%) showed proteolytic, lipolytic, and chitinolytic activity, produced indol-acetic acid and siderophores. By 16S rDNA gene sequencing, antagonists were identified indicating that most of them belong to *Bacillus* (56.4%), *Pseudomonas* (27.7%), and *Paenibacillus* (7.4%). Also, several of the bacterial isolates identified had not been previously reported in olive, including *Acinetobacter* sp. (3,2%), *Chryseobacterium vyrstaatense* (2,1%), *Rhodococcus wratislaviensis* (1,1%), and *Rahnella* sp. (1,1%). Several of those bacteria showing high and broad antagonistic mechanisms may therefore be considered for further analyses as promising biocontrol agents against *V. dahliae* in olives.

Finally, in this research, we carried out a deep study focused on new purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. with biotechnological interest inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in Southern Spain. Based on physiological and biochemical characterization, phylogenetic analysis of different genes including 16S rDNA, *gyrB* and *vioA* (implicated in synthesis of violacein), we isolated and identified for the first time *Duganella* spp. associated with the rhizosphere of woody plants in Mediterranean environments that are able to produce violacein, a blue-purple secondary metabolite with important biological, medical and industrial applications. The seven *Duganella* spp. strains studied could be identified as potential two new species and were differentiated according to their host of origin (*Duganella baetica* in wild olives *versus* *Duganella olivae* in cultivated olives). All the *Duganella* spp. strains produced violacein *in vitro*, with natural production levels higher (up to 65 x times) than those reported before for other violacein-producing bacteria. This high yields, make them good candidates for their biotechnological exploitation since low

violacein yields is considered one of the main limitation of wild strains for massive exploitation and production. Although no *in vitro* inhibitory activity was demonstrated for plant-pathogenic gram negative bacteria and fungi, crude violacein filtrates inhibited gram positive bacteria. We also observed that *Duganella* spp. strains from wild and cultivated olives showed proteolytic and lipolytic activities and a weak siderophore production which deserves deeper investigation as potential inoculants of olive planting stocks to enhance their growth and establishment and suppression of soilborne plant pathogens.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I: Introducción general	1
I.1. EL CULTIVO DEL OLIVO	3
I.1.1. El origen del cultivo del olivo.....	3
I.1.2. Requerimientos de cultivo.....	4
I.1.3. Superficie de cultivo.....	5
I.1.4. Diversidad biológica.....	7
I.1.5. Evolución de los sistemas de manejo de cultivo	9
I.1.6. Enfermedades del olivo	10
I.1.6.1. Principales enfermedades que afectan al olivo.....	10
I.1.6.2. <i>Verticillium dahliae</i> como agente causal de la Verticilosis del olivo.....	11
I.1.6.3. La Verticilosis del olivo en Andalucía	13
I.1.6.4. Estrategias de control de la Verticilosis del olivo.....	14
I.2. ECOLOGÍA MICROBIANA	19
I.2.1. Origen de la microbiología.....	19
I.2.2. Importancia de los microorganismos en la biosfera.....	19
I.2.3. Desarrollo de la Ecología Microbiana moderna.....	20
I.2.4. La biología molecular en el estudio de las comunidades de microorganismos.....	22
I.3. METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A LAS PLANTAS	24
I.3.1. Metodologías cultivo-dependiente.....	24
I.3.2. Metodologías cultivo-independiente.....	26
I.4. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN LA RIZOSFERA Y ENDOSFERA DEL SISTEMA RADICAL DE LAS PLANTAS	31
I.4.1. Diversidad e importancia de las bacterias en la biosfera.....	31
I.4.2. Interacción planta – bacteria en la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas en el sistema radical de las plantas	32
I.4.3. Importancia de los exudados del sistema radical como nicho ecológico de las comunidades bacterianas	35

I.4.4. Diversidad estructural y funcional de las comunidades bacterianas en la rizosfera y endosfera.....	36
I.4.5. Perspectivas y direcciones futuras de la Ecología Microbiana del sistema radical de las plantas.....	40
I.5. CONTROL DE ENFERMEDADES Y ECOLOGÍA MICROBIANA.....	41
I.5.1. Control de enfermedades de las plantas.....	41
I.5.2. Definición de Control Biológico.....	43
I.5.3. Agentes de control biológico en la agricultura actual.....	44
I.5.4. Mecanismos de control biológico en la rizosfera y endosfera de las plantas.....	46
I.5.5. Métodos de estudio en la interacción antagonista-patógeno en la rizosfera y endosfera.....	51
I.5.6. Importancia de <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> spp. como agentes de control biológico...	52
I.6. ECOLOGÍA MICROBIANA EN EL SISTEMA RADICAL DEL OLIVO.....	56
I.6.1. Los sistemas de cultivo del olivar y su efecto en la rizosfera del olivo.....	56
I.6.2. La rizosfera del olivo como fuente de microorganismos con potencial biotecnológico.....	59
I.6.3. La Ecología Microbiana en el olivar Andaluz.....	60
 CAPÍTULO II: Objetivos.....	 63
 II.2. NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN PLANTEADA	 65
II.3. OBJETIVOS.....	67
 CAPÍTULO III: El tipo de suelo y su sistema de manejo determinan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en fincas de olivar con manejo orgánico en Andalucía.....	 69
III.1. RESUMEN.....	73
III.2. INTRODUCCIÓN.....	74
III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
III.3.1. Zonas de estudio y muestreos de campo.....	79
III.3.2. Extracción y cuantificación del ADN del suelo.....	82

III.3.3. Perfiles de las comunidades bacterianas.....	82
III.3.4. Estadísticos de diversidad y análisis de datos.....	84
III.4. RESULTADOS.....	85
III.5. DISCUSIÓN.....	95
III.6. BIBLIOGRAFÍA.....	100
CAPÍTULO IV: Influencia del material vegetal de origen y genotipo de la planta sobre la estructura y densidades de población de las comunidades bacterianas en el sistema radical de plántones de olivo (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i>).....	107
IV.1. RESUMEN.....	111
IV.2. INTRODUCCIÓN.....	112
IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	118
IV.3.1. Cultivares de olivo.....	118
IV.3.2. Efecto del tiempo de crecimiento y cultivar de olivo sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera.....	118
IV.3.3. Extracción de las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera.....	119
IV.3.4. Determinación de las densidades de población de las bacterias heterotróficas cultivables totales y <i>Pseudomonas</i> fluorescentes más abundantes.....	120
IV.3.5. Extracción de ADN de la rizosfera y análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal fluorescente (FT-RFLP).....	121
IV.3.6. Análisis de datos.....	123
IV.4. RESULTADOS.....	124
IV.4.1. Densidades de población de bacterias cultivables en la rizosfera y endosfera de plántones de olivo procedentes de viveros de olivo certificados.....	124
IV.4.2. Dinámica de las densidades de población de bacterias cultivables en la rizosfera y endosfera de olivo durante el tiempo de crecimiento.....	126
IV.4.3. Diversidad y estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera de plántones de olivo procedentes de viveros de olivo certificados.....	129
IV.4.4. Cambios en la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera de plántones de olivo durante el tiempo de crecimiento.....	131
IV.5. DISCUSIÓN.....	133
IV.6. BIBLIOGRAFÍA.....	143

CAPÍTULO V: Las comunidades bacterianas asociadas a la raíz de olivos silvestres (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>) constituyen reservorios únicos de bacterias con potencial antagonista frente a <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.....	153
V.1. RESUMEN.....	157
V.2. INTRODUCCIÓN.....	158
V.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	163
V.3.1. Áreas de muestreo.....	163
V.3.2. Muestras de raíces y suelo rizosférico.....	165
V.3.3. Extracción de ADN y genotipado de acebuches mediante microsatélites.....	167
V.3.4. Extracción de las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera.....	167
V.3.5. Extracción de ADN de la rizosfera.....	169
V.3.6. Perfil de las comunidades bacterianas rizosféricas.....	169
V.3.7. Detección <i>in vitro</i> de bacterias antagonistas.....	171
V.3.8. Producción de exoenzimas y metabolitos secundarios.....	172
V.3.9. Identificación de las bacterias antagonistas.....	173
V.3.10. Análisis de datos.....	175
V.4. RESULTADOS.....	176
V.4.1. Caracterización de las áreas de acebuches muestreadas en el estudio.....	176
V.4.2. Perfiles de las comunidades bacterianas de acebuches.....	177
V.4.3. Poblaciones de bacterias cultivables de la rizosfera y endosfera del sistema radical de acebuches.....	179
V.4.4. Antagonismo <i>in vitro</i> frente a <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	181
V.4.5. Identificación de bacterias antagonistas.....	182
V.5. DISCUSIÓN.....	186
V.6. BIBLIOGRAFÍA.....	194

CAPÍTULO VI: Nuevas bacterias de pigmentación morada productoras de violaceína con interés biotecnológico pertenecientes al género <i>Duganella</i> aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado.....	203
VI.1. RESUMEN.....	207
VI.2. INTRODUCCIÓN.....	208
VI.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	211
VI.3.1. Aislamiento, y condiciones de cultivo de las cepas con pigmentación morada.....	211
VI.3.2. Caracterización fisiológica y bioquímica.....	212
VI.3.3. Caracterización molecular mediante análisis filogenético de los genes 16S ADNr y <i>gyrB</i> y <i>vioA</i>	214
VI.3.4. Detección, producción y extracción de violaceína.....	217
VI.3.5. Actividad antibacteriana y antifúngica <i>in vitro</i>	218
VI.4. RESULTADOS.....	219
VI.4.1. Aislamiento de las cepas con pigmentación morada.....	219
VI.4.2. Caracterización molecular mediante análisis filogenético de los genes 16S ADNr y <i>gyrB</i>	220
VI.4.3. Caracterización fisiológica y bioquímica, y condiciones de cultivo óptimas.....	222
VI.4.4. Detección, producción y extracción de violaceína y análisis filogenético de <i>vioA</i> ..	227
VI.4.5. Actividad antibacteriana y antifúngica <i>in vitro</i>	230
VI.5. DISCUSIÓN.....	230
VI.6. BIBLIOGRAFÍA.....	238
VI.7. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	245
CAPÍTULO VII: Discusión general y Conclusiones.....	249
VII.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	249
VII.2. CONCLUSIONES.....	263
Bibliografía general.....	267

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. Introducción general.....	1
Fig. I.1. Zonas climáticas aptas para el cultivo del olivo (Fuente: Barranco <i>et al.</i> 2004).....	5
Fig. I.2. Distribución superficie del olivar en España, año 2005 (Fuente: Dossier Exposición Tierras del Olivo, Jaén, Úbeda, Baeza y Baena (Diciembre 2007- Abril, 2008).....	6
Fig. I.3. Distribución superficie del olivar en Andalucía, año 2005 (Fuente: Dossier Exposición Tierras del Olivo, Jaén, Úbeda, Baeza y Baena (Diciembre 2007-Abril, 2008).....	7
Fig. I.4. Síntomas de Apoplejía (a), Decaimiento Lento (b), Coloración vascular observada en el tallo (c) (Fuente: Prof. Jiménez-Díaz).....	12
Fig. I.5. Metodología cultivo-independiente FT-RFLP en el análisis de comunidades bacterianas.....	28
CAPÍTULO II. Objetivos.....	63
CAPÍTULO III. El tipo de suelo y su sistema de manejo determinan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en fincas de olivar con manejo orgánico en Andalucía.....	69
Fig. III.1. Localización de las zonas de estudio y muestreo, <i>Sierra Morena</i> y <i>Campaña</i> , en la provincia de Córdoba, Andalucía. LT (laboreo ligero), G (pastoreo); T (laboreo); M (desbroce); NV-SM (vegetación natural, <i>Sierra Morena</i>); NV-C (vegetación natural, <i>Campaña</i>).....	81
Fig. III.2. Análisis canónico de los TRFs de las muestras de suelo para tipos de suelo (<i>MspI</i> y <i>RsaI</i> separadas o combinadas) y proyección de las diferentes muestras de suelo en el plano formado por las diferentes combinaciones de las funciones canónicas ('Canonical root') 1 a 3.....	91
Fig. III.3. Análisis canónico de los TRFs de las muestras de suelo para tipos de manejo (<i>MspI</i> y <i>RsaI</i> separadas o combinadas) y proyección de las diferentes muestras de suelo en el plano formado por las diferentes combinaciones de las funciones canónicas ('Canonical root') 1 a 3.....	94
CAPÍTULO IV. Influencia del material vegetal de origen y genotipo de la planta sobre la estructura y densidades de población de las comunidades bacterianas en el sistema radical de plántones de olivo (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i>).....	107
Fig. IV.1. Análisis de agregación de bacterias heterotróficas cultivables totales y <i>Pseudomonas</i> sp. fluorescentes en la rizosfera y endosfera de 11 muestras de patrones de olivo de diferentes viveros. Los datos de seis muestras de raíz independientes se combinaron previamente al análisis de cada combinación vivero-cultivar de olivo. El método no ponderado par-grupo usando promedios aritméticos (UPGMA) fue aplicado para generar la matriz de similitud generada de los datos de densidad de población [Log unidades formadoras de colonias (ufc/g) de raíz] utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. Los valores de correlación cofenética son indicados en cada nodo. (*)= Los grupos y subgrupos fueron definidos en base a un valor de corte de 34,79% y 40,75%, respectivamente. La intensidad del color verde es proporcional a los valores de densidad de población.....	125

Fig. IV.2.	Dinámica de poblaciones de bacterias heterotróficas cultivables totales (BCT) (A y C) y <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes (Ps) (B y D) en la rizosfera (A y B) y endosfera (C y D) de 6 cultivares de plantones de olivo tras 12 y 18 meses después del trasplante a un suelo natural y crecimiento en condiciones naturales. Los valores corresponden a la media de seis plantas independientes \pm error estándar.....	129
Fig. IV.3.	Análisis de agregación de los perfiles de fragmentos de restricción terminal fluorescentes de las poblaciones bacterianas de la rizosfera de 11 muestras de patrones de olivo generados por la enzima <i>MspI</i> . Seis amplificaciones independientes se combinaron previamente al análisis para cada combinación vivero-olivo. El método no ponderado par-grupo usando promedios aritméticos (UPGMA) fue aplicado para generar la matriz de similitud de la abundancia relativa de cada fragmento de restricción terminal (TRFs) utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. La riqueza (Número de TRFs) e índice de Diversidad de Shannon-Weiner fueron incluidos también para cada muestra. Los valores de correlación cofenética están indicados en cada nodo. (*)= Los grupos y subgrupos fueron definidos en base a un valor de corte de 20,21% y 17,76% respectivamente.....	131
Fig. IV.4.	Análisis de agregación de los perfiles de TRFs de las poblaciones bacterianas de la rizosfera de 5 muestras de patrones de cultivares de olivo generados por la enzima <i>MspI</i> . Seis amplificaciones independientes se combinaron previamente al análisis para cada combinación tiempo de incubación-olivo. El método no ponderado par-grupo usando promedios aritméticos (UPGMA) fue aplicado para generar la matriz de similitud de la abundancia relativa de cada TRFs utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. La riqueza (Número de TRFs) e índice de Diversidad de Shannon-Weiner fueron incluidos también para cada muestra. Los valores de correlación cofenética están indicados en cada nodo. (*)= Los grupos y subgrupos fueron definidos en base a un valor de corte de 79,03% y 58,29% respectivamente.....	133
CAPITULO V. Las comunidades bacterianas asociadas a la raíz de olivos silvestres (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>) constituyen reservorios únicos de bacterias con potencial antagonista frente a <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.....		153
Fig. V.1.	Localización de los reductos de acebuches muestreados en las provincias de Cádiz y Córdoba, en Andalucía, sur de España.....	164
Fig. V.2.	Análisis de agregación de los datos combinados de las características climáticas y físico-químicas de suelos de los lugares muestreados en el estudio. Todas las propiedades del suelo fueron estimadas según la metodología descrita previamente (Álvarez <i>et al.</i> , (2007) por el Laboratorio Oficial Agroalimentario de Córdoba (Córdoba. España) y las características climáticas se obtuvieron a partir SIGMAPA, Sistema de Información Geográfica del Ministerio español de "Medioambiente, Medio Rural y Marino" (http://sig.mapa.es/geoportal/). Valores de "bootstrap" se indican en cada nodo. Silvestre (W), Asilvestrado (F), Cultivado (C) hipótesis tipo de acuerdo con criterios medioambientales, históricos y demográficos. Las localizaciones con acebuches verdaderos se encuentran marcadas en la figura.....	166
Fig. V.3.	Procedimiento para el aislamiento aislados bacterianos procedentes de la rizosfera y endosfera de olivo silvestre y la caracterización del potencial antagonista frente <i>Verticillium dahliae</i> patotipo defoliante.....	174

Fig. V.4.	Análisis de agregación de los perfiles de fragmentos de restricción terminales fluorescentes de la población de bacterias de la rizosfera de las once muestras de acebuches generados por los enzimas <i>MspI</i> y <i>RsaI</i> . Tres amplificaciones independientes se combinaron previamente al análisis para cada localización. El método UPGMA fue aplicado para generar la matriz de similitud de la abundancia relativa de cada uno de los fragmentos de restricción terminal (TRF) utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. El análisis combinado de agregación de los patrones TRFs de <i>MspI</i> + <i>RsaI</i> corresponden al promedio de los datos obtenidos con los dos enzimas de restricción analizados de forma independiente. La Riqueza (Número de TRFs) e Índice de diversidad de Shannon-Weiner para ambos enzimas de restricción fueron incluidos también para cada localización. Los valores de "Bootstrap" se indican en cada nodo. Las localizaciones con acebuches verdaderos se encuentran marcadas en la figura en un recuadro gris.....	178
Fig. V.5.	Análisis de agregación de ocho características fenotípicas de antagonismo analizados con el coeficiente de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. Valores de soporte estadístico o "Bootstrap" se indican en cada nodo. La puntuación de antagonismo total, y el índice de puntuación relativa de antagonismo (RASI), origen en la raíz, localización de la muestra y la identificación a nivel de género de las 94 aislados bacterianos se indican en la figura. (*) = Los grupos que fueron definidos en base a un valor del coeficiente de corte conjunto del 26,14%.....	185
CAPÍTULO VI. Nuevas bacterias de pigmentación morada productoras de violaceína pertenecientes al género <i>Duganella</i> con interés biotecnológico aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado		189
Fig. VI.1.	Procedimiento de aislamiento y pruebas de caracterización fisiológica de los aislados de <i>Duganella</i> spp. de olivo silvestre y cultivado, demostración de la producción de violaceína y análisis de su actividad antimicrobiana.....	202
Fig. VI.2.	Relación filogenética (Neighbor-Joining) de las secuencias 16S ADNr de las cepas de <i>Duganella</i> spp. de olivo silvestre y cultivado con otras bacterias productoras de violaceína. Las secuencias de ADN más cercanas del gen 16S ADNr en el GenBank fueron usadas para comparación. Las cepas marcadas en negrita han sido caracterizadas en este estudio, son cepas tipo o referidas específicamente en el texto del manuscrito. La secuencia AJ496445 de <i>Collimonas fungivorans</i> CTE227 fue usada como grupo externo. Los números son números de acceso en la base de datos del GenBank. Solo se indican los valores 'Bootstrap' mayores de 50% en los nodos de los cluster principales.....	207
Fig. VI.3.	Relación filogenética (Neighbor-Joining) de las secuencias de los genes <i>gyrB</i> (A) y <i>vioA</i> (B) de las cepas de <i>Duganella</i> spp. de olivo silvestre y cultivado con otras bacterias productoras de violaceína. Las secuencias de ADN de ambos genes disponibles en el GenBank fueron usadas para comparación. Las secuencias del gen <i>gyrB</i> de <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> (A) y <i>vioA</i> de <i>Collimonas</i> sp. (B) fueron usadas como grupo externo. Solo se indican los valores 'Bootstrap' mayores de 50% en los nodos de los cluster principales.....	209
Fig. VI.4.	Análisis de Cluster combinando los datos fisiológicos de la Tabla VI.2, resultados APIZYM y Biolog GN2 de <i>Duganella</i> spp. de olivos silvestres y cultivados. El algoritmo UPGMA fue aplicado al consenso de la matriz de similaridad generada para cada experimento de forma independiente usando el coeficiente Dice (binario) o el coeficiente de correlación de Pearson (datos APIZYM y Biolog). Valores en los nodos indica el soporte de 'bootstrap'.....	212

Fig. VI.5.	A. Producción de violaceína por <i>Duganella</i> spp. creciendo en el medio descrito por Wang <i>et al.</i> , 2009 usando 10% o 20% v/v de inicio del cultivo. Barras con diferente letra en mismo color y forma o con un asterisco (*) indicaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre cepas o entre cultivos iniciales, respectivamente, de acuerdo al contraste protegido de Fisher de las mínimas diferencias significativas. Los resultados son valores de medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. B, Espectro visible-UV de la violaceína comercial y extracto crudo en etanol de cultivos de <i>Duganella</i> spp. de olivo silvestre (Baetica.33) y cultivado (CICY-60 y MICO-M2). Para evitar repetición, únicamente tres espectros UV-vis de HPLC de cepas seleccionadas son mostrados.....	214
Fig. VI.S1.	Análisis de Cluster combinando los datos fisiológicos de la Tabla VI.2 (A), resultados APIZYM (B) y Biolog GN2 (C) de <i>Duganella</i> spp. de olivos silvestres y cultivados. El algoritmo UPGMA fue aplicado al consenso de la matriz de similitud generada para cada experimento de forma independiente usando el coeficiente Dice (binario, Tabla VI.2,A) o el coeficiente de correlación de Pearson (datos APIZYM (B) y Biolog(A). Valores en los nodos indica el soporte de 'bootstrap'.....	233
CAPÍTULO VII. Discusión General y Conclusiones.....		235
Bibliografía general.....		253

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I. Introducción general.....	1
Tabla I.1. Influencia de factores bióticos y abióticos en las comunidades microbianas de la rizosfera y endosfera de las plantas.....	39
CAPÍTULO II. Objetivos.....	63
CAPÍTULO III. El tipo de suelo y su sistema de manejo determinan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en fincas de olivar con manejo orgánico en Andalucía.....	69
Tabla III.1. Índices de diversidad (rango) asociados a las comunidades bacterianas totales de 46 suelos de olivar y 12 áreas naturales localizados en diferentes tipos de suelo bajo diferentes sistemas de manejo del suelo (SMS) en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (<i>Campiña</i> y <i>Sierra Morena</i>) en Andalucía, sur de España.....	86
Tabla III.2. Resumen estadístico del análisis de función discriminante de los fragmentos de restricción terminal estandarizado (TRF) que determinan la diversidad de las comunidades bacterianas totales de 46 suelos de olivar y 12 áreas naturales en diferentes tipos de suelo y bajo diferentes sistemas de manejo del suelo (SM) localizados en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (<i>Campiña</i> y <i>Sierra Morena</i>) en Andalucía, sur de España (Figura III.1).....	88
Tabla III.3. Matriz de clasificación posterior al análisis discriminante de los suelos de las fincas de olivar y los suelos de las áreas naturales cercanas con diferente tipos de suelo localizados en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (<i>Campiña</i> y <i>Sierra Morena</i>) en Andalucía, sur de España.....	90
Tabla III.4. Matriz de clasificación posterior al análisis discriminante de los suelos de las fincas de olivo y los suelos de las áreas naturales cercanas con diferente tipos de manejo (SMS) en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (<i>Campiña</i> y <i>Sierra Morena</i>) en Andalucía, sur de España.....	93
CAPÍTULO IV. Influencia del material vegetal de origen y genotipo de la planta sobre la estructura y densidades de población de las comunidades bacterianas en el sistema radical de plantones de olivo (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i>).....	107
Tabla IV.1. Efecto del tiempo de incubación tras el trasplante sobre las densidades de población de bacterias heterotróficas cultivables totales (BCT) y <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes (Ps) presentes en la rizosfera y endosfera en diferentes cultivares de olivo.....	128
CAPÍTULO V. Las comunidades bacterianas asociadas a la raíz de olivos silvestres (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>) constituyen reservorios únicos de bacterias con potencial antagonista frente a <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.....	153
Tabla V.1. Localización y características de las muestras de acebuches utilizadas en este estudio...	163

Tabla V.2.	Densidades de población de bacterias cultivables y aislados bacterianos antagonistas frente a <i>Verticillium dahliae</i> recuperados de la rizosfera y la endosfera de acebuches en las once localizaciones muestreadas en Andalucía, sur de España (Fig. V.1.).....	180
Tabla IV.3.	Distribución taxonómica de los 94 aislamientos de bacterias antagonistas frente a <i>Verticillium dahliae</i> patotipo defoliante recuperados de la rizosfera y la endosfera de acebuches en Andalucía, España.....	183
CAPÍTULO VI. Nuevas bacterias de pigmentación morada productoras de violaceína pertenecientes al género <i>Duganella</i> con interés biotecnológico aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado		189
Tabla VI.1.	Localización, altitud y características climáticas de los sitios de origen de las cepas de <i>Duganella</i> spp.....	198
Tabla VI.2.	Características fenotípicas diferenciales de las cepas de <i>Duganella</i> spp. aisladas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados y de dos <i>Duganella</i> spp. descritas.....	211
Tabla VI.S1.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción del pigmento morado en medio R2A de las cepas aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado.....	234
CAPÍTULO VII. Discusión General y Conclusiones.....		235
CAPÍTULO VII. Bibliografía.....		253

CAPÍTULO I

I

Introducción general

I.1. EL CULTIVO DEL OLIVO

I.1.1. El origen del cultivo del olivo

El olivo es considerado el árbol emblemático de la Cuenca Mediterránea y representa una de las plantas domesticadas y cultivadas más antiguas (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). El olivo se puede encontrar en dos formas, una llamada olivo silvestre o acebuche (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y otra como olivo cultivado (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) (Green, 2002).

Existen dos hipótesis sobre el origen del olivo, una que postula que proviene de las costas de Siria, Líbano e Israel y otra que lo considera originario del Asia Menor. Su origen se situaría en la antigua Mesopotamia hacia el año 4000 a. de C., en los actuales Irán y Siria, aunque existen referencias históricas de su cultivo en la mayoría de las culturas del Oriente Próximo y el Mediterráneo Oriental. Las distintas civilizaciones que se desarrollaron en la Cuenca Mediterránea dispersaron el olivo con sus desplazamientos. Los primeros indicios del cultivo del olivo en las costas mediterráneas españolas coinciden con el dominio romano, aunque fueron posteriormente los árabes los que lo impulsaron en Andalucía, convirtiendo a España en el primer país productor de aceite de oliva a nivel mundial (Rallo *et al.*, 2005).

Tras el asentamiento del cultivo del olivo en áreas de la Cuenca Mediterránea, a partir del siglo XV, con los viajes oceánicos de Colón, Magallanes y Juan Sebastián Elcano, el olivo fue introducido y se extendió por el Nuevo Mundo y actualmente, se cultiva también en Australia, Japón y Sudáfrica (Barranco *et al.*, 2004).

La selección de individuos más interesantes por características tales como la producción, el tamaño del fruto, el contenido en aceite o la adaptación al medio en las zonas donde se fue estableciendo el olivo ha

ido originando una gran diversidad de cultivares en los diferentes países del Mediterráneo (Barranco *et al.*, 2004).

I.1.2. Requerimientos de cultivo

La singularidad del olivo reside en su carácter de cultivo permanente, su longevidad, plasticidad y su gran adaptación a la climatología mediterránea. Aunque los requerimientos climatológicos del olivo son escasos, su distribución está delimitada por la isoterma de -7° C como temperatura media absoluta anual, presentándose a partir de esta temperatura problemas con heladas en los cultivares más tempranos. El olivo es muy tolerante a la sequía típica mediterránea y, aunque el óptimo de precipitaciones para él se sitúa en torno a los 650 mm, adecuadamente distribuidos, puede cultivarse en secano en aquellas zonas en las que la pluviometría media anual no sea menor de 400 mm (Navarro y Parra, 2008).

En su amplia zona de distribución, el olivo es un árbol que ocupa una gran diversidad de suelos (llanos o con fuertes pendientes), aunque su productividad se ve favorecida por texturas francas, franco-arcilloso-arenoso y arcillo-arenosas con drenaje óptimo debido a la alta sensibilidad del sistema radical al encharcamiento prolongado de agua. Crece bien en suelos que van de moderadamente ácidos a moderadamente alcalinos (pH entre 5,5 y 8,5) y resiste mejor la salinidad que otros árboles frutales (Navarro y Parra, 2008).

El hábitat del olivo se concentra entre las latitudes 30° y 45° tanto en el Hemisferio Norte como en el Hemisferio Sur (Fig. I.1) (Barranco *et al.*, 2004), en regiones climáticas del tipo mediterráneo, caracterizadas por un verano seco y caluroso. En el Hemisferio Sur el olivar está presente en latitudes más tropicales cuyo clima es modificado por la altitud. Como cultivo típicamente mediterráneo, la práctica totalidad de la superficie mundial dedicada al cultivo del olivar se encuentra localizada en los países

ribereños de la Cuenca Mediterránea, destacando sobre todos España e Italia, seguidas de Grecia, Marruecos, Siria, Túnez y Turquía (Anónimo, 2004).

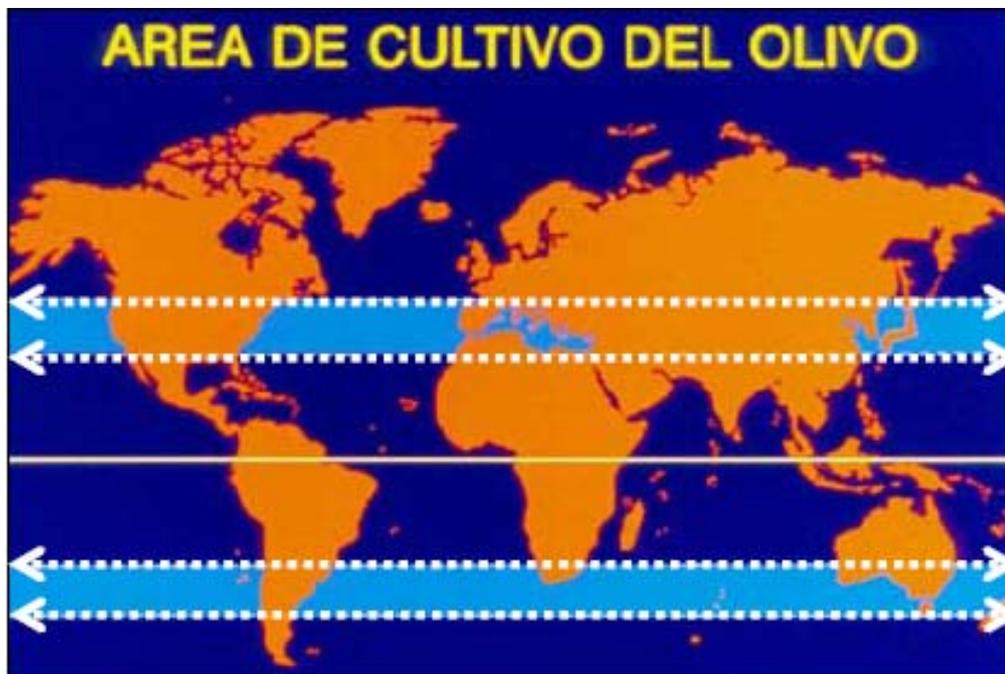


Figura I.1. Zonas climáticas aptas para el cultivo del olivo (Fuente: Barranco *et al.* 2004).

I.1.3. Superficie de cultivo

El patrimonio oleícola existente se estima aproximadamente en 960 millones de olivos, de los que unos 945 millones (98% del total) se sitúan en la Cuenca Mediterránea donde ocupan cerca de 9,5 millones de hectáreas distribuidas principalmente en España e Italia, y en menor extensión Grecia, Marruecos, Siria, Túnez y Turquía (Anónimo, 2004). De los 960 millones de olivos, unos 50 millones se cultivan en regadío. Por otra parte, la producción del olivar alcanza una media anual del orden de 14×10^6 t de aceitunas, de las que el 90% se dedican a la obtención de aceite y el 10% se consumen elaboradas como aceituna de mesa (Civantos, 2008).

La superficie de cultivo dedicada al olivar en España ascendía en 2007 a 2.513.419 ha, de las cuales el 96% son destinadas a la obtención de aceite y el 4% a aceituna de mesa (ESYRCE, 2007).

Las zonas de producción de olivar en España se extienden por gran parte del territorio nacional, que comprende la superficie al sur de una línea imaginaria que uniera Lérida y Cáceres e incluye por tanto, Andalucía, Castilla-La Mancha, Cataluña, Extremadura, Levante y Valle del Ebro (Fig. I.2).

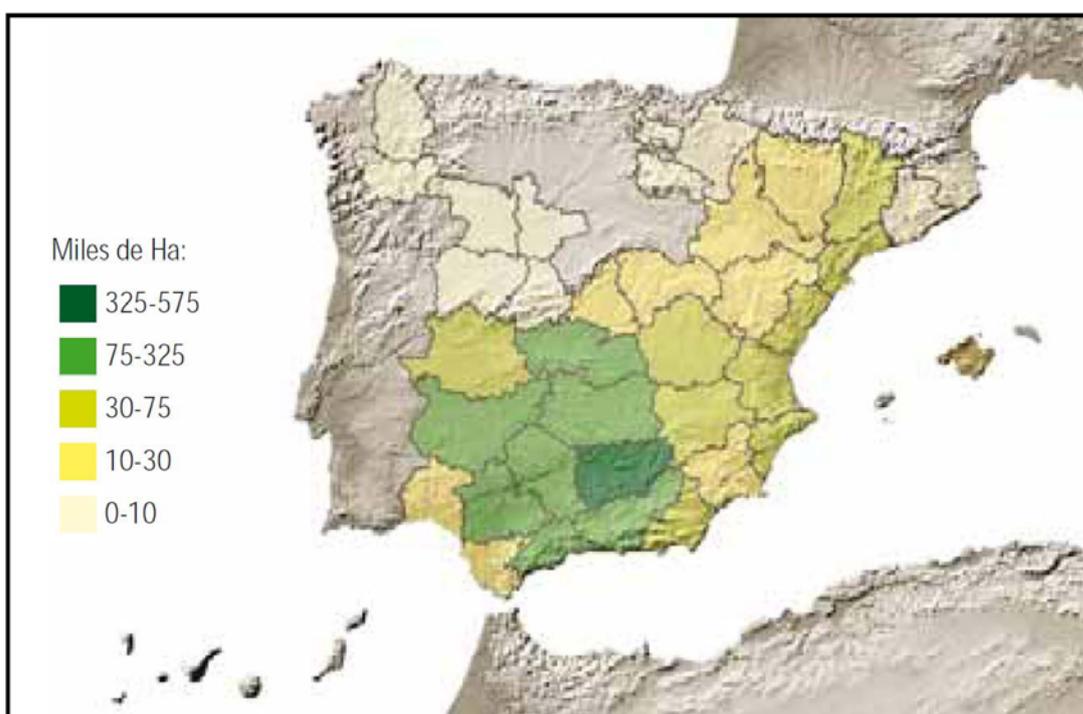


Figura I.2. Distribución superficie del olivar en España, año 2005 (Fuente: Dossier Exposición Tierras del Olivo, Jaén, Úbeda, Baeza y Baena (Diciembre 2007- Abril, 2008).

El olivar andaluz tiene un papel destacado en esta distribución por representar el 62,4% de la superficie nacional del cultivo (Anónimo, 2006a) (Fig. I.3). La importancia del olivar en Andalucía se pone de manifiesto si consideramos que su superficie total ascendía a 1.401.425 ha en el año 2006 (Anónimo, 2006b). De la superficie total andaluza destinada a este cultivo, el 90% corresponde a olivar destinado a obtención de aceite de oliva y el 10% restante a la producción de aceituna de mesa. El olivar andaluz es un cultivo mayoritariamente de secano, aunque el regadío

representa el 19,2% de la superficie total (Anónimo, 2006a). Jaén y Córdoba son las principales provincias olivareras de la Comunidad Autónoma concentrando el 61,3% de la superficie de olivar en Andalucía, seguidas en importancia por Sevilla, Granada y Málaga (Fig. I.3) (Anónimo, 2002).

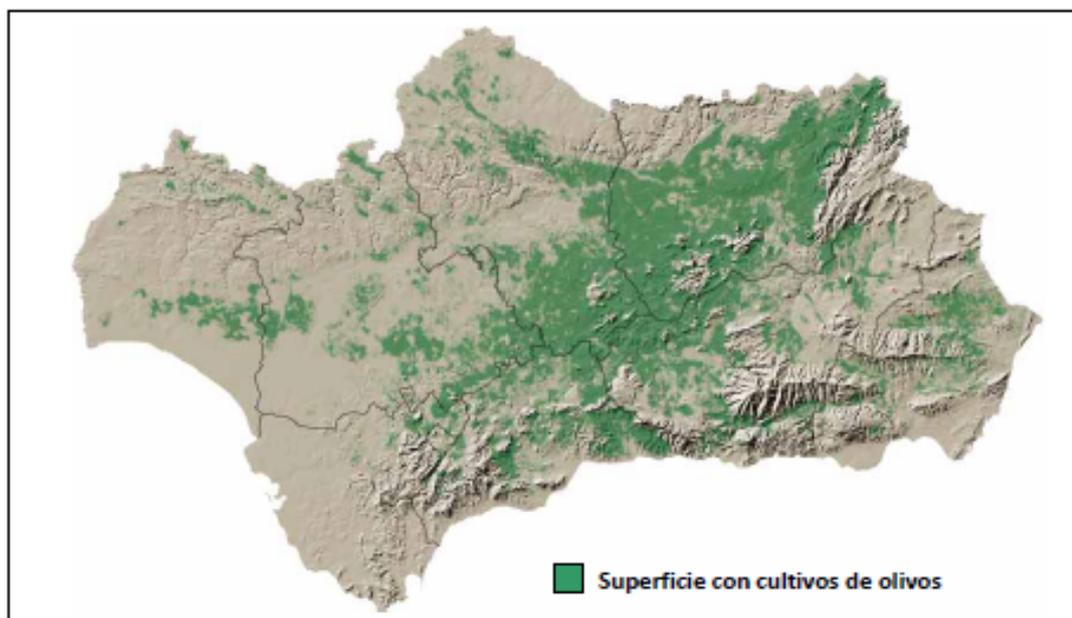


Figura I.3. Distribución superficie del olivar en Andalucía, año 2005 (Fuente: Dossier Exposición Tierras del Olivo, Jaén, Úbeda, Baeza y Baena (Diciembre 2007-Abril, 2008).

Por otra parte, el olivar en Andalucía representa el 33% de las tierras de cultivo y 16% de la superficie total de la región andaluza, suponiendo el 26% de la producción Final Agraria Andaluza. Otro parámetro que indica el destacado papel del olivar andaluz en España es la producción de aceite de oliva, que representa el 85% del total nacional (Informe Carbonell 2007/2008), el 46% de la producción de la Unión Europea y más del 36% de la producción mundial (Anónimo, 2006a).

I.1.4. Diversidad biológica

El término Biodiversidad fue acuñado por el Biólogo y humanista E.O. Wilson en su libro *Biodiversity* (Wilson, 1988) y hace referencia a la

variabilidad de los organismos vivos a cualquier nivel, comprendiendo la diversidad de los genes, de las especies y de los ecosistemas en los que se desarrollan. En este contexto, el olivo se caracteriza por contener una alta riqueza de recursos genéticos, probablemente debido al origen autóctono de sus variedades obtenidas por la selección de materiales diferentes en cada zona. La diversidad genética existente en el olivo ha sido objeto de estudio de numerosas investigaciones relacionadas con la identificación, análisis genealógicos y de variabilidad genética en el olivo cultivado y silvestre mediante diversos métodos morfológicos y moleculares (Ganino *et al.*, 2006).

Recientemente, los resultados de las investigaciones realizadas por Belaj *et al.* (2010), estudiando la diversidad y relaciones filogenéticas entre cultivares locales y silvestres de olivo en tres regiones olivareras en España (Andalucía, Cataluña y Valencia), revelaron que existe una abundante variación alélica y altos valores de diversidad genética en estas zonas de cultivo del olivo, y que particularmente en Andalucía las poblaciones de olivo silvestre conforman un cluster genético separado e independiente del resto de los olivares cultivados del mismo área y de las otras zonas olivareras, así como del resto de las poblaciones de olivo silvestre. Estos resultados sugieren que las poblaciones silvestres de olivo en Andalucía pueden representar verdaderos acebuches silvestres y no formas ferales, los cuales podrían constituir un interesante recurso genético para mejoradores, por la posibilidad de contener importantes caracteres genéticos de importancia para la agricultura tales como fuentes de resistencia a patógenos y a condiciones adversas del medio ambiente, o ser una fuente de microorganismos con potencial para su uso en agricultura como agentes de biocontrol o por su potencial biotecnológico.

En España se estima que existen más de 500 denominaciones varietales diferentes, las cuales son el resultado de muchos años de difusión y selección y que han dado como resultado en la actualidad esta enorme diversidad de cultivares autóctonos (Barranco, 2008). En Andalucía siete variedades de olivo (Picual, Lechín de Sevilla, Hojiblanca,

Picudo, Manzanilla de Sevilla, Verdial de Huévar y Nevadillo Negro) constituyen el 90% de la superficie cultivada, mientras que otro 5% está constituido por ocho variedades (Arbequina, Gordal Sevillana, Aloreña, Verdial de Vélez-Málaga, Lechín de Granada, Pico Limón, Manzanilla Serrana, y Alameño Blanco) (CAP-2003).

La variedad predominante en Andalucía es 'Picual', con 857.746 hectáreas cultivadas (58,2% de la superficie total), siendo también la variedad más extendida, empleándose en gran medida en nuevas plantaciones por su productividad y alto rendimiento graso. Su importancia en el total del olivar andaluz viene dada por el peso que tiene en las provincias de Jaén, donde supone casi la totalidad del olivar (98,6% de la superficie), Granada (69,3%) y Córdoba (39,8%) (CAP-2003).

I.1.5. Evolución de los sistemas de manejo de cultivo

Durante los últimos años, en el olivar español, y fundamentalmente el Andaluz, se han producido notables innovaciones tecnológicas, que confieren confianza al sector productivo respecto de la capacidad de mantener su estabilidad y competitividad para hacer frente al progresivo incremento de exportación de aceite de oliva a nuevos países consumidores. Entre tales innovaciones, que definen la 'Nueva olivicultura', destacan el establecimiento de nuevas plantaciones de mayor densidad (400-600 árboles/ha) y el desarrollo de una industria viverística para obtener plantas de un solo tronco y precoz entrada en producción (Rallo *et al.*, 2005).

Paralelamente, en la actualidad, se están implementando métodos alternativos al laboreo convencional para minimizar la erosión, uno de los problemas fundamentales del olivar en numerosas zonas, incluyendo el laboreo ligero, o el no laboreo combinado con control mecánico (desbrozadora), químico (herbicidas) o animal de las malas hierbas, o manteniendo éstas como cubierta vegetal natural o siembra de una

cubierta en otoño y eliminación de éstas en primavera mediante la aplicación de herbicidas, desbroce o pastoreo, entre otros (CAP-JA, 2003; Milgroom *et al.*, 2006; 2007). Otras innovaciones han permitido que los sistemas tradicionales de secano sean sustituidos de forma paulatina por plantaciones intensivas con riego por goteo para incrementar y estabilizar la producción. Además, el olivar no ha sido ajeno a la tendencia mundial de uso de estrategias sostenibles de bajo impacto ambiental, de forma que se están promoviendo nuevos sistemas de manejo como la producción integrada y ecológica con objeto de reducir el impacto negativo que tiene el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes.

I.1.6. Enfermedades del olivo

I.1.6.1. Principales enfermedades que afectan al olivo

Más de medio centenar de enfermedades que afectan al olivo, son causadas por agentes bióticos (hongos, bacterias, virus, fitoplasmas, nematodos y fanerógamas parásitas) o abióticos (Trapero y Blanco, 2008). Dentro de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de olivo en España, destacan la Antracnosis o Aceitunas jabonosas (*Colletotricum acutatum* Simmonds), el Repilo (*Fusicladium oleaginum* (Castagne) Ritschel & U. Braun (= *Spilocaea oleagina* (Castagne) S. Hughes), la Tuberculosis (*Pseudomonas syringae* Van Hall pv. *savastanoi*) y la Verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb.). Actualmente, la Verticilosis es una de las enfermedades fúngicas más extendida en el mundo y una de las más importantes que afectan al olivar en España por su amplia distribución, extensión y gravedad de las pérdidas que ocasiona (Trapero y Blanco, 2008). Estas circunstancias, han motivado el desarrollo de numerosas investigaciones concernientes a la diversidad genética, epidemiología, manejo y control de este patógeno no solamente en España sino en todas las zonas productoras de olivo a nivel mundial.

1.1.6.2. *Verticillium dahliae* como agente causal de la Verticilosis del olivo

El agente causal de la Verticilosis del olivo es el hongo *Verticillium dahliae* que es capaz de infectar más de 200 especies vegetales, principalmente dicotiledóneas herbáceas y leñosas, muchas de ellas cultivadas, y numerosas plantas arvenses en regiones de clima templado (Bell, 1992; 1994; Harris, 1998; Hiemstra, 1998; McCain *et al.*, 1981; Pegg y Brady, 2002). Además, se ha aislado de 55 géneros de plantas arvenses sintomáticas o asintomáticas, que pueden actuar como reservorios del patógeno (Jiménez-Díaz *et al.*, 1998; Pegg y Brady, 2002).

Los estudios realizados hasta la fecha indican que las poblaciones de *V. dahliae* presentan notable variabilidad en su virulencia y en su dotación genética [(diversidad de grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) y de grupos moleculares] (Daayf *et al.*, 1995; Collado-Romero *et al.*, 2010).

La virulencia diferencial de aislados de *V. dahliae* sobre cultivo de algodón y tomate (Schnathorst y Mathre, 1966) ha permitido diferenciar dos patotipos por su capacidad de defoliar o no estas plantas de forma completa, denominados defoliante (D) o no defoliante (ND), respectivamente, cuya diferenciación tiene gran significación fitopatológica.

La Verticilosis del olivo se manifiesta mediante dos tipos de síndromes denominados Apoplejía y Decaimiento Lento (Blanco López *et al.*, 1984), estrechamente relacionados con los patotipos D y ND, respectivamente. (Fig. 1.4 a,b).



Figura 1.4. Síndromes de Apoplejía (a), Decaimiento Lento (b), Coloración vascular observada en el tallo (c) (Fuente: Prof. Jiménez-Díaz).

La descripción más detallada de ambos síndromes ha sido realizada por Blanco-López *et al.* (1984) en Andalucía, quienes indicaron que la Apoplejía se desarrolla entre final de invierno y principio de primavera comenzando con el desarrollo de una tonalidad marrón clara de las hojas, que se enrollan longitudinalmente hacia el envés y permanecen secas adheridas al brote o rama. El síndrome apopléjico se caracteriza por la muerte rápida de brotes, ramas principales y ramas secundarias. Esta necrosis tiene lugar desde el extremo distal hacia la base del órgano y puede terminar con la muerte del árbol. A veces, en el xilema de las zonas afectadas se desarrolla una coloración castaño-oscura de distribución irregular (Fig. 1.4 c). (Blanco-López *et al.*, 1984).

El síntoma más característico del Decaimiento Lento es la necrosis de las inflorescencias, cuyas flores quedan momificadas y persisten en el árbol afectado o caen en caso de que la necrosis se desarrolle al inicio de la floración. Las hojas de brotes afectados se tornan verde-mate, necrosan y caen generalmente antes de secarse, salvo las más distales que permanecen adheridas hasta después del verano. Los síntomas en flores y hojas comienzan casi siempre al mismo tiempo, si bien en ocasiones los primeros preceden a los síntomas foliares, y ambos continúan con la muerte del brote que puede adquirir externamente un color pardo-rojizo de

distribución sectorial, y en cuyos tejidos vasculares no siempre se observa una coloración castaño-oscura. Los síntomas del Decaimiento Lento comienzan a final de abril, después de los que caracterizan a la Apoplejía, y se desarrollan de forma gradual durante la primavera hasta principios del verano. Esto contrasta con el desarrollo de la Apoplejía, que no continúa tras la muerte de las ramas afectadas (Blanco-López *et al.*, 1984). Un mismo árbol puede sufrir los dos síndromes secuencialmente, aunque el desarrollo de éstos es distinguible en el tiempo. Además, salvo por la muerte de la planta, los árboles afectados de Decaimiento Lento pueden mostrar una recuperación sintomatológica en años sucesivos, dando lugar a una aparente disminución de la incidencia de la enfermedad a lo largo del tiempo (Jiménez Díaz *et al.*, 1998).

I.1.6.3. La Verticilosis del olivo en Andalucía

La Verticilosis del olivo se identificó por primera vez en España en el año 1975, en campos de experimentación en Córdoba (Caballero *et al.*, 1980) aunque existían descripciones anteriores de ciertos síntomas que podrían corresponder a Verticilosis. Entre, los años 1980-1983, se realizó la primera prospección, en las principales provincias olivareras andaluzas (Jaén, Córdoba, Sevilla y Granada) encontrándose que el 38,5% de 122 plantaciones inspeccionadas estaban afectadas por la enfermedad con incidencia de árboles enfermos variable entre 10 y 90%. La Verticilosis del olivo estaba bien establecida en los olivares de Jaén y Córdoba y era menos prevalente en las otras provincias (Blanco-López *et al.*, 1984). Desde entonces la enfermedad se ha ido extendiendo de forma continuada, en proceso aparentemente paralelo al de modernización y extensión del cultivo del olivo, de forma que no es posible entender la Verticilosis del olivo sin haber comprendido la evolución de este cultivo y su historia más reciente (Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995). En los últimos años ha habido un aumento paulatino en la incidencia y severidad de los ataques de Verticilosis en las nuevas plantaciones establecidas con

sistemas de cultivo intensivo en regadío provocando importantes pérdidas económicas (Bejarano-Alcázar, 2003), y la enfermedad se ha extendido a otras Comunidades Autónomas (e.g., Aragón, Castilla-La Mancha, Comunidad Valenciana, y Extremadura) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003; Landa *et al.*, 2009).

En Andalucía, el patotipo ND está presente en las zonas de cultivo de algodón y olivo a lo largo del valle del Guadalquivir desde 1981 (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996). Por el contrario, el patotipo D permaneció restringido a campos de algodón en la zona del bajo Guadalquivir (Marismas, Sevilla) hasta 1985 (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996), y después se ha extendido hacia las zonas central y alta del valle (provincias de Córdoba y Jaén) (Bejarano-Alcázar *et al.*, 2001) donde ha sido detectado recientemente en nuevas plantaciones de olivar causando defoliación intensa de hojas verdes (Bejarano-Alcázar, 2005; Jiménez-Díaz *et al.*, 2010; López-Escudero y Blanco-López, 2001; Mercado-Blanco *et al.*, 2003b).

De estos estudios destacar uno reciente llevado a cabo en nuestro grupo de investigación, que incluyó un total de 637 aislados de *V. dahliae* obtenidos de 433 olivos muestreados aleatoriamente en 65 olivares de Córdoba, Granada, Huelva, Jaén, y Sevilla, ha revelado que el 78% de dichos aislados son del patotipo defoliante. Más importante aún, todos los aislados muestreados en olivares de las provincias de Jaén (16) y Sevilla (14), y en 20 de 21 olivares muestreados en la de Córdoba, fueron identificados como pertenecientes al patotipo D (Jiménez-Díaz *et al.*, 2010).

I.1.6.4. Estrategias de control de la Verticilosis del olivo

El conocimiento actual que se viene produciendo durante los últimos años mediante investigación científica sobre la naturaleza etiológica y epidemiológica de la Verticilosis del olivo, indica convincentemente que esta enfermedad es de naturaleza compleja lo cual dificulta de forma notable que su control pueda ser alcanzado mediante una única medida.

Consecuentemente, la estrategia de control de esta enfermedad se debe basar fundamentalmente en la aplicación de acciones de prevención. Estas acciones de prevención deben ser implementadas fundamentalmente antes de la plantación, en una estrategia de manejo integrado (Jiménez Díaz *et al.*, 2003; Tjamos, 1993), ya que las medidas posplantación son muy limitadas o en algunos casos inexistentes.

Las medidas de control llevadas a cabo antes del establecimiento de la plantación son de tipo preventivo y pueden ir dirigidas al material vegetal o al lugar donde éste va a ser establecido. En cualquiera de los casos, todas ellas deberían ser llevadas a cabo de forma conjunta puesto que desestimar la aplicación de alguna de ellas supone incrementar la ineficacia de las otras. En consecuencia, basándonos solamente en las características inherentes de la enfermedad, la puesta en práctica de una estrategia de manejo integrado de la Verticilosis del olivo mediante medidas de carácter preventivo previas a la plantación incluiría: i) evitar el uso de suelos infestados por *V. dahliae*, así como la proximidad de la plantación a cultivos herbáceos susceptibles a éste, en particular algodón; ii) analizar el suelo sobre su contenido en microesclerocios de *V. dahliae*, para lo cual se dispone de métodos microbiológicos y moleculares contrastados experimentalmente; iii) desinfestar el suelo que contenga inóculo elevado o virulento del hongo, ya sea de forma generalizada o localizada, mediante solarización y/o aplicación de productos fumigantes autorizados; iv) utilizar material de plantación certificado libre de *V. dahliae*; v) la utilización de material de plantación tanto variedades como patrones tolerantes/resistentes a la Verticilosis (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003), y vi) la protección de este materia vegetal de la infección por el patógeno mediante la aplicación de agentes de control biológico (ACBs) .

Entre las medidas a utilizar una vez establecida la plantación podemos citar la utilización de productos químicos y biológicos, y la realización de prácticas culturales y solarización.

La fumigación con materias activas fungicidas y nematicidas ha sido efectiva para el control de Verticilosis en cultivos como algodón, fresa,

patata, y tomate (Pegg y Brady, 2002). Aunque formulaciones a base de bromuro de metilo y cloropicrina (tricloronitrometano) han sido utilizadas con éxito para el control de la Verticilosis en diversos cultivos (Pegg y Brady, 2002), la legislación europea actual prohíbe el uso de ellos, y otros compuestos como formol y metam-Na (N-metilditiocarbamato de sodio) tienen un uso restringido según los distintos países (Tjamos y Jiménez-Díaz, 1998). En la actualidad no existe ningún producto químico autorizado para el control específico de la Verticilosis del olivo, aunque si existen dos materias activas (Procloraz y Folpet) incluidas en el registro de productos fitosanitarios para el control de Verticilosis (<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro>). En la lucha química contra la Verticilosis del olivo también se ha utilizado la técnica de inyecciones de diversos principios activos (como fosety-Al o benomilo, que actúa una vez transformado en carbendazima) en el tronco del olivo (Gallego-Álvarez, 1994; Mule *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 1992). Aunque el uso de productos fungicidas para el control de la Verticilosis del olivo se ha investigado en numerosas ocasiones, todavía no ha sido demostrado convincentemente que esta estrategia de control de la enfermedad sea suficientemente satisfactoria. En la mayoría de los casos, los resultados no son reproducibles o muy variables, con lo cuál es difícil el establecimiento de un claro efecto fungicida o protector en la planta.

Existen diversas prácticas de cultivo que permiten mantener un manejo adecuado de la Verticilosis. Entre ellas podemos destacar: No utilizar cultivos herbáceos susceptibles de forma intercalada, controlar la flora arvense, especialmente las de hoja ancha, y plantas huéspedes, evitar o minimizar en lo posible las prácticas de laboreo que causen heridas en las raíces y el uso de vehículos o maquinaria que hayan sido empleados previamente en parcelas afectadas por la Verticilosis, usar preferentemente sistemas de riego por goteo para evitar la dispersión del patógeno y vigilar el punto de captación de agua, realizar la poda de árboles afectados preferiblemente durante el verano (Levin *et al.*, 2003), y antes de que ocurra la defoliación de la planta, y cuando ésta se realice,

empezar a podar siempre por los árboles que no presenten síntomas dejando para finalizar los que parezcan estar enfermos, retirar y destruir lo antes posible los restos de plantas enfermas (Mol y Scholte, 1995). Asimismo, se debe realizar una fertilización equilibrada evitando el exceso de nitrógeno y la falta de potasio (Harris, 1998). Por otro lado, las enmiendas orgánicas se ha demostrado que favorecen el control de las enfermedades de las plantas mediante la estimulación de las poblaciones microbianas antagonistas y la modificación de las propiedades químicas del suelo (Antonopoulos *et al.*, 2008; Conn *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 1996)

En la actualidad, cada vez son mas frecuentes las investigaciones sobre el desarrollo de alternativas de manejo mediante el uso de productos biológicos contra la Verticilosis en olivo, ya sea a través de un efecto directo del ACB contra el patógeno por diferentes mecanismos de antagonismo o indirectamente mediante la protección y promoción de las condiciones de vigor (e.g., promotores de crecimiento, proliferación de raíces, tolerancia a sequía etc.) en las plantas antes del establecimiento de la plantación lo cual permitiría disminuir la predisposición y consecuentemente el riesgo de infección por el patógeno (Mercado-Blanco y Bakker, 2007; Peyvandi *et al.*, 2010; Porrás-Piedra *et al.*, 2005). Sin embargo y a pesar de que son muchos los productos biológicos (*Pseudomonas* spp., micorrizas, *Trichoderma* spp.) que actualmente se están promocionando como eficaces para el control de la Verticilosis del olivo, en muchas ocasiones su eficacia no consta que haya sido demostrada experimentalmente y menos aún publicada en ámbitos científicos o técnicos (Jiménez-Díaz *et al.*, 2009).

Se ha contrastado experimentalmente en condiciones controladas y de campo el efecto beneficioso de algunas formulaciones específicas de estos microorganismos al suprimir en cierta medida –no eliminar- el desarrollo de la Verticilosis. En este contexto, algunas investigaciones recientes han demostrado la eficacia de microorganismos para la protección de plantones de olivo de la variedad ‘Picual’ con la inoculación de los hongos *Trichoderma asperellum* y *T. gamsii* (Jiménez-Díaz *et al.*,

2009), la utilización de *Pseudomonas fluorescens* en las variedades 'Picual' y 'Arbequina' (Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2009), y protección de árboles jóvenes de olivo con *Paenibacillus alvei* en las variedades Amfissis y Kalamon (Sassalou *et al.*, 2009).

La utilización de microorganismos antagonistas como ACBs de patógenos está considerada un componente básico de las medidas de control de enfermedades para utilizar de forma combinada junto a todas las demás estrategias disponibles que impacten lo menos posible al medioambiente y de esta forma conseguir la sostenibilidad del cultivo. Ésto, indudablemente supone que el conjunto de métodos erradicativos utilizados para el control de la Verticilosis en el futuro, podrían complementarse con el control biológico, contribuyendo de esta manera al desarrollo de nuevos métodos de manejo integrado de la enfermedad (Landa *et al.*, 2009; Tjamos, 1993; Trapero y Blanco, 2008). En el caso particular del olivo, cada vez son más frecuentes la incorporación de nuevas tecnologías mediante el uso de inoculantes microbianos que incluyen: aplicación de bioprotectores, fitoestimuladores o biofertilizantes durante la producción en vivero para incrementar la calidad y vigor de plántulas. El interés actual en aplicar esta tecnología de bajo impacto al medio ambiente ha enfatizado el estudio y manejo de las interacciones microbianas en suelo, rizosfera y plantas (Pastor, 2008).

En este contexto, el estudio de la **ecología microbiana** del suelo y rizosférica asociadas al olivo silvestre o acebuche, como una fuente de variabilidad genética escasamente explorada, representa una oportunidad en la búsqueda de nuevos componentes microbianos de interés agronómico que pudieran no encontrarse en las variedades cultivadas y que permita incorporar nuevos elementos para el desarrollo de estrategias para un mejor manejo de esta enfermedad y consecuentemente repercutir positivamente sobre aspectos económicos y ambientales en el sistema productivo actual del cultivo de olivo.

I.2. ECOLOGÍA MICROBIANA

I.2.1. Origen de la Microbiología

Históricamente, se reconoce que el inicio de la Microbiología tuvo lugar con Antón van Leeuwenhoek a finales del año 1600 quién mediante la mejora de las técnicas de observación a través de lentes, diseñó el primer microscopio y realizó las primeras observaciones de microorganismos. Sin embargo, se considera que la disciplina de la Microbiología se desarrolló realmente a finales del siglo XIX cuando Robert Koch y Louis Pasteur realizando observaciones sobre la asociación de gérmenes con las enfermedades, abordaron los primeros estudios de la interacción de microorganismos con su medio ambiente. Sin embargo, a pesar de que dichas investigaciones no fueron propiamente de naturaleza ecológica, sí desarrollaron procedimientos técnicos para la manipulación de microorganismos que actualmente se siguen utilizando en Ecología Microbiana. Posteriormente, en los inicios del siglo XX, Martines Beijerinck y Sergei Winogradsky, tomando en consideración las condiciones químicas del medio ambiente, observaron que existían condiciones selectivas que influenciaban el desarrollo de los microorganismos, lo cual sentó las bases de las primeras investigaciones que incluyeron el enriquecimiento de cultivos para el aislamiento de microorganismos y de esta forma estudiar su actividad biogeoquímica (Konopka, 2006).

I.2.2. Importancia de los microorganismos en la biosfera

Los microorganismos conforman una gran fuente de diversidad genética. La amplia diversidad y el potencial que representan están muy lejos de ser conocida y explorada totalmente. Su papel primario en la biosfera reside en su actividad como catalizadores de prácticamente todos los procesos de los ciclos biogeoquímicos (e.g., nitrógeno, azufre, oxígeno,

y fósforo) (Prosser *et al.*, 2007; Schmidt, 2006). Los microorganismos son cosmopolitas, ya que están presentes en casi todos los medio ambientes acuáticos y terrestres, así como en medio ambientes extremos con condiciones físicas y químicas en donde ninguna otra forma de vida puede desarrollarse. Los microorganismos se encuentran asociados con todas las especies de plantas y animales estableciendo diversos tipos de interacciones ya sea como simbioses o patógenos. Sin embargo, las condiciones particulares de cada medio ambiente, son las que condicionan y determinan de manera fundamental esa diversidad, ya que cada ecosistema presenta características únicas que son las que permiten seleccionar poblaciones de microorganismos diferentes con actividades metabólicas específicas, y que a su vez impactan en la distribución espacial e interacción entre ellos dentro de ese ecosistema concreto (Konopka, 2006; Prosser *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008).

I.2.3. Desarrollo de la Ecología Microbiana moderna

El término Ecología fue propuesto por Ernst Haeckel en el año de 1866 y proviene de la palabra griega “*oekologie*” que significa “el estudio de los hogares en la naturaleza”. Uno de los principales problemas que se le atribuye al escaso desarrollo de conocimiento sobre la biodiversidad de microorganismos procariontes en el análisis de ecosistemas, ha sido que la Ecología Microbiana tradicionalmente se ha separado conceptualmente de la Ecología de organismos superiores (Torsvik y Ovreas, 2007).

El concepto de Ecología de comunidades surge del estudio de Ecología en plantas y animales, en donde una comunidad esta definida por el aglomerado y ensamblaje de múltiples especies en un medio ambiente contiguo en el cual los organismos viven juntos e interactúan unos con otros. La disciplina de la Ecología Microbiana surge como una rama de la Ecología, centrándose en el estudio de las interacciones de los microorganismos con los factores bióticos y abióticos del medio ambiente,

en el ensamble biológico de esas especies en el ecosistema y su estructuración, cuáles son sus interacciones funcionales y como cambia su estructura en el espacio y tiempo. (Ducklow, 2007; Røling, 2007).

La Ecología Microbiana moderna tuvo su origen en los años 1950's, con las investigaciones realizadas por Robert Hungate y colaboradores en el análisis de los ecosistemas en el rúmen de bovinos, quienes además fueron reconocidos por el desarrollo de las técnicas de cultivo de organismos anaeróbicos estrictos. Posteriormente, Kluyver y van Niel, realizando investigaciones sobre la actividad hidrolítica de la celulosa por la microflora intestinal contenida en escarabajos, termitas y rúmen de bovino, incorporan los primeros análisis que incluyen la enumeración de organismos en un habitat determinado, la cuantificación de su actividad metabólica y la habilidad de adaptarse a los cambios producidos en el medio ambiente (Schmidt, 2006).

En los mismos años (1950's), se introdujo en la Ecología Microbiana la utilización de radioisótopos para medir el porcentaje de los procesos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza y el porcentaje de crecimiento de las comunidades bacterianas (Schmidt, 2006). Posteriormente, tuvo un amplio desarrollo el análisis cuantitativo de los procesos biogeoquímicos mediante las técnicas de cultivo puro de microorganismos. Sin embargo, estas técnicas fueron consideradas como poco efectivas en analizar numéricamente la abundancia de microorganismos provenientes del medio ambiente ya que la proporción de microorganismos que formaban colonias en medio de cultivo sintético sólo representaban una pequeña fracción del total de microorganismos presentes en un medio ambiente determinado. Esto fue considerado uno de los principales limitantes, convirtiéndose en uno de los retos substanciales de estudio en la investigación de esta disciplina para determinar con mayor precisión la composición de las comunidades microbianas (Ward *et al.*, 1992).

En años posteriores, se inicia el desarrollo de metodologías cuya aplicación no dependían del cultivo de microorganismos en medios

sintéticos. En este contexto, aunque Zuckerkandl y Pauling en 1965 fueron los que aportaron la estructura conceptual para el análisis filogenético molecular de comunidades microbianas, fue Carl Woese, en 1980, quien aplicó los métodos de filogenia molecular y demostró que las secuencias de pequeñas subunidades ribosomales de la molécula de ARN podían ser utilizada para analizar las relaciones filogenéticas de todas la formas de vida. Esto es, a partir de ácidos nucleicos obtenidos directamente de un medio ambiente natural, la amplificación a partir de éstos de la secuencia de genes diana por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación de éstos amplicones y la comparación de estas secuencias en bases de datos, permitiría no depender del cultivo de microorganismos para determinar su presencia en un medio ambiente determinado.

I.2.4. La biología molecular en el estudio de las comunidades de microorganismos

En los últimos diez años, numerosas investigaciones utilizando las técnicas de cultivo independiente que se han citado anteriormente han representado un desarrollo importante en el área de la Ecología Microbiana repercutiendo en importantes aportaciones en el conocimiento de la diversidad filogenética y abundancia relativa de microorganismos presentes en diferentes habitats, revelando la extraordinaria y compleja riqueza y la gran dinámica de los tipos filogenéticos presentes en muchos medio ambientes, descubriéndose así nuevos Phyla que no podrían haberse determinado por métodos de cultivo-dependiente (Ley *et al.*, 2006; Prosser *et al.*, 2007; Schmidt, 2006; Walker y Pace, 2007).

Uno de los principales retos de la ecología microbiana moderna es profundizar en el conocimiento sobre la estructura y la diversidad de poblaciones de microorganismos, la cual comprende dos importantes componentes como son la riqueza de taxones y la abundancia relativa de

éstos dentro de una comunidad, y mediante este conocimiento entender los mecanismos a través del cual las comunidades de microorganismos interactúan y determinan el funcionamiento de un ecosistema en particular. Un gran impulso al desarrollo de la Ecología Microbiana moderna fue el análisis de la secuencia de genes de la región 16S del ADN ribosómico (ADNr) a partir de ADN obtenido directamente de muestras de diversos nichos ecológicos, lo cual ha proporcionado un mayor entendimiento de la diversidad microbiana global y propiciado que en los últimos años cada vez sean más frecuentes las investigaciones que incorporan estas nuevas técnicas que permiten detectar y estudiar con mayor precisión la diversidad de taxones en un medio ambiente determinado (Sogin *et al.*, 2006; Tringle y Hugenholtz, 2008).

Así, en los últimos 20 años se ha producido un salto metodológico importante y, del uso del microscopio y aislamiento tradicional de los cultivos de microorganismos en placas de Petri, se ha pasado al análisis comparativo de las secuencias de ADN ribosómico (ADNr) amplificadas por PCR y a métodos independientes de cultivo basados en éstas secuencias (Pace, 1997; Porazinska *et al.*, 2009; Tringe y Hugenholtz, 2008). El uso de marcadores genéticos para estudiar la diversidad y estructura de comunidades de microorganismos complejas ha resultado ser una excelente herramienta en Ecología Microbiana. En la actualidad, diversas técnicas de cultivo-independiente (que se describen en el apartado I.3.2. con mayor extensión) se han desarrollado y han sido utilizadas en Ecología Microbiana para realizar análisis de diversidad de poblaciones de microorganismos en la rizosfera y que están permitiendo responder a cuestiones básicas como son los patrones de distribución espacial y temporal de los microorganismos, su biogeografía y su biodiversidad funcional en ecosistemas complejos como el suelo-rizosfera (e.g., Barberán y Casamayor 2010; Blouin-Banhead *et al.*, 2004; Galand *et al.*, 2009; 2010; Hervás *et al.*, 2009; Reche *et al.*, 2009; Sommaruga y Casamayor, 2009; Tamames y Moya, 2008; van Elsas *et al.*, 2003).

I.3. METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A LAS PLANTAS

En la actualidad se han desarrollado un gran número de metodologías que permiten estudiar la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas en plantas, todas ellas presentan ventajas y limitaciones para el óptimo estudio, lo que enfatiza la importancia previa al desarrollo de una investigación sobre esta materia, y en función de las metas que se pretendan alcanzar, de seleccionar la técnica más apropiada que permita un adecuado análisis de la estructura y diversidad de estas comunidades.

I.3.1. Metodologías cultivo-dependiente

Una de las primeras y más comunes metodologías desarrolladas para el estudio de las comunidades bacterianas fue el aislamiento directo en medios de cultivo artificial. El conteo de bacterias en placas fue uno de los primeros métodos clásicos de cultivo-dependiente y de los más ampliamente utilizados, basado fundamentalmente en la enumeración de bacterias generalmente expresado como unidades formadoras de colonias (ufc). Sin embargo, esta metodología como se ha comentado con anterioridad presenta algunas limitaciones importantes a considerar; una de ellas es que mediante las técnicas de cultivo, el conteo de ufc es muy variable y muy dependiente de las condiciones de incubación, y del medio de cultivo. Así, se obtiene un análisis limitado de la diversidad bacteriana por los diferentes factores intervinientes entre los que destacan: la dificultad de diseñar medios de crecimiento individuales que pretendan abarcar la amplia diversidad de todos los grupos de bacterias, de reproducir las condiciones metabólicas y de señalización que están involucradas en el crecimiento bacteriano, así como la abundancia de aislados bacterianos en el medio ambiente que no crecen en medios de

cultivo artificiales o que se desconocen sus requerimientos nutricionales para poder inducir su crecimiento en medios artificiales. Esto condujo a la conclusión de que en diferentes medio ambientes existe una gran diferencia entre el número de células viables presentes en una muestra y el número de colonias recuperadas en medio de cultivo (Buée *et al.*, 2009., Eilers *et al.*, 2000; Felske *et al.*, 1999). Se ha estimado que el 99% de las células microbianas presentes en las raíces de las plantas observadas por microscopía no son recuperadas por medios de cultivo *in vitro*. Situación conocida como 'La gran anomalía del cultivo en placa' (big plate anomaly) (Goodman *et al.*, 1998).

En los últimos años, la intensa investigación desarrollada en el área de la Ecología Microbiana ha permitido obtener mejoras substanciales en el estudio de las comunidades bacterianas en plantas a través de este método, mediante un mejor diseño y uso de técnicas de cultivo convencionales empleando medios sintéticos modificados con la incorporación de suplementos que permiten una mayor aproximación y simulación de las condiciones naturales del medio ambiente en las que se desarrollan las comunidades bacterianas (e.g., extractos de suelo, nutrientes específicos, compuestos antioxidantes y moléculas de señalización). La combinación de estas técnicas ha promovido el desarrollo de protocolos más sensibles con un alto rendimiento para el aislamiento, crecimiento y cultivo de diferentes microorganismos (Barer y Harwood, 1999; Bogosian y Bourneuf, 2001; Nybore *et al.*, 2007; van Overbeek *et al.*, 2004).

A pesar de las limitaciones que se presentan con el uso de técnicas de cultivo dependiente para el análisis de comunidades bacterianas en suelo, rizosfera y endosfera de plantas, se han desarrollado métodos muy útiles mediante este sistema basados en el análisis del perfil fisiológico a nivel de comunidades como el sistema biológico Biolog assay® y sustratos enzimáticos como el APY-ZYM®, los cuales han sido y están siendo utilizados para caracterizar la diversidad microbiana basándose en los patrones de asimilación de sustratos o actividades metabólicas (Garland y

Mills, 1991); métodos de conteo de placa mediante el uso de medios de cultivo diseñados para poblaciones con un determinado perfil metabólico como las bacterias heterótrofas de lento crecimiento y oligotróficas, a través de la utilización de medios con baja concentración nutritiva (e.g., medio R2A); medios semiselectivos para poblaciones de bacterias específicas (e.g., 1/3 Medio B de King (KMB) suplementado con antibióticos para poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes) y poblaciones totales heterótrofas (e.g., 1/10 caldo de triptona-soja (TSB) suplementado con antibióticos) (Landa *et al.*, 2006). Todas estas técnicas proporcionan información muy valiosa de los niveles de población y capacidad funcional de la rizosfera, las cuales pueden ser utilizadas para detectar diferencias cualitativas y cuantitativas en las comunidades microbianas cultivables de diferentes plantas en relación al efecto de factores bióticos y abióticos (Grayston, 1998; Landa *et al.*, 2006).

I.3.2. Metodologías cultivo-independiente

En la actualidad, la aplicación de técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos (ADN o ARN) extraídos directamente de muestras del medio ambiente suelo, rizosfera y endosfera, ha tenido un amplio desarrollo y se han considerado como parte esencial en el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas en plantas, ya que su utilización no depende del uso de medios de cultivo y por lo tanto excluye las limitaciones propias de las técnicas de cultivo-dependiente mencionadas anteriormente. La gran mayoría de estos métodos se fundamentan en 3 importantes etapas metodológicas, las cuales consisten principalmente en: *i*) una etapa inicial de extracción de ADN de la muestra del medio ambiente en estudio lo suficientemente representativa y de alta calidad para PCR; *ii*) una amplificación mediante PCR de los fragmentos diana del ADN genómico de relevancia taxonómica (e.g., 16S ADNr, *gyrB*) o funcional (genes de nitrificación etc.); y *iii*) la comparación de los

fragmentos obtenidos basados en su tamaño y/o secuencia. La utilización de estas técnicas ha permitido en muchos casos revelar y contestar muchos de los interrogantes sobre la riqueza, abundancia y función de las comunidades bacterianas asociadas a las plantas (Buée *et al.*, 2009).

Mediante esta herramienta se han podido identificar nuevas unidades taxonómicas operacionales (OTUs), o que anteriormente se desconocía que formasen parte de la estructura de las comunidades bacterianas que colonizan la rizosfera, endosfera y suelo. La exploración de estos nuevos grupos, y el poder dilucidar el papel que desempeñan en la interacción con las plantas, está abriendo una nueva era en la investigación de la Ecología Microbiana en la rizosfera y endosfera (Buée *et al.*, 2009; Fulthrope *et al.*, 2008; Kielak *et al.*, 2010).

Sin embargo, es importante señalar que las técnicas de cultivo-independiente también presentan diferentes niveles de resolución y otros limitantes en su aplicación que repercuten en la precisión de los análisis y en las conclusiones del mismo, principalmente durante la extracción del ADN y amplificación de los genes diana. El método de extracción debe ser apropiado y permitir obtener rendimientos representativos de las comunidades bacterianas autóctonas en estudio, así como con la suficiente pureza e integridad para su amplificación mediante PCR (Salvaudon y Shikoff, 2008).

Entre las técnicas de cultivo-independiente mas ampliamente utilizadas para el análisis de la estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera de las plantas, se encuentran aquellas que se fundamentan en el uso de perfiles o 'huellas' moleculares (fingerprinting) tales como: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización [denaturing and temperature gradient gel electrophoresis (DGGE)], electroforesis en gel con gradiente de temperatura [temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)], análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple [single-strand conformation polymorphisms (SSCP)], reacción en cadena de la polimerasa de la heterogeneidad de longitud del fragmento [length heterogeneity-PCR (LH-PCR)], polimorfismos de la longitud de los

fragmentos terminales de restricción [fluorescent terminal-restriction fragment length polymorphism (FT-RFLP)], análisis automatizado del espacio intergénico ribosomal [automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA)] y librerías genéticas de clones de fragmentos amplificados de la región 16S ARNr [16S rRNA gene clone libraries] entre otras (Marzorati *et al.*, 2008; Oros-Sichler *et al.*, 2007; Ranjard *et al.*, 2000). Estas técnicas proporcionan una visión general de los miembros más abundantes en cada muestra visualizada mediante patrones de bandas o picos de diversa intensidad.

Entre todas éstas, la técnica FT-RFLP ha demostrado ser uno de los métodos que reflejan con mayor precisión la estructura y composición de comunidades bacterianas (Liu *et al.*, 1997). Es un método ampliamente utilizado en el análisis comparativo de comunidades microbianas, ya que se considera rápido, altamente reproducible y que revela un alto número de OTUs mayor que otros métodos moleculares (Fig. 5), aportando información significativa para el estudio de la estructura y dinámica de poblaciones en diversos medio ambientes (Thies, 2007).

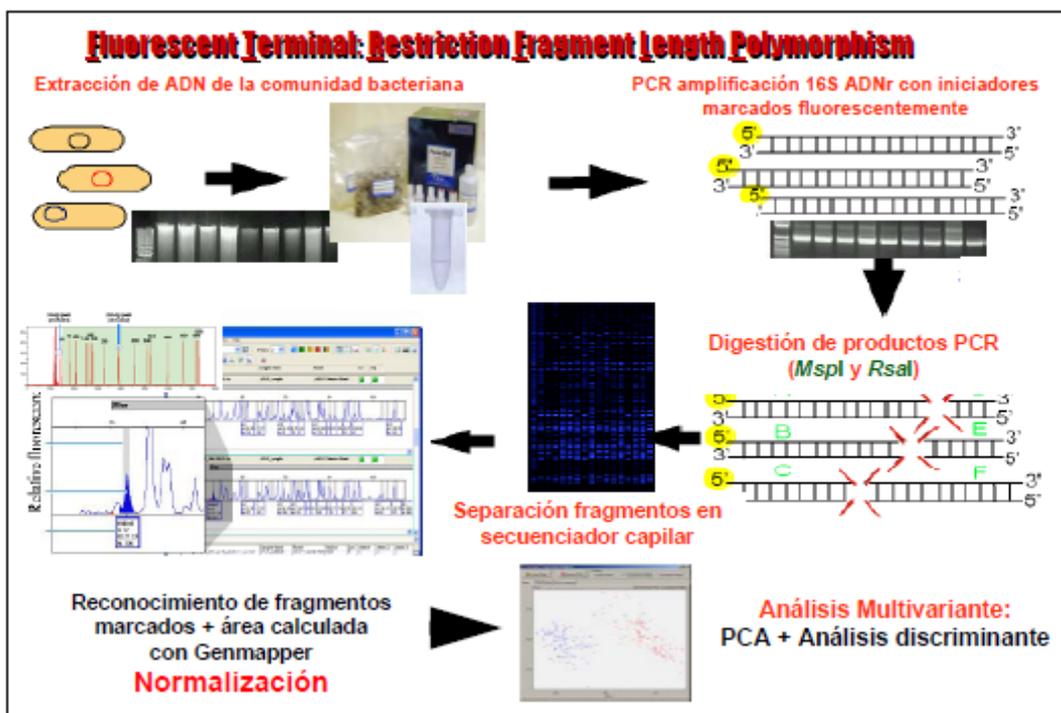


Figura I.5. Metodología cultivo-independiente FT-RFLP en el análisis de comunidades bacterianas

Otras técnicas utilizadas en el estudio de las comunidades bacterianas están basadas en métodos como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) o la microscopía electrónica utilizando la proteína verde fluorescente o derivados de ésta como marcador. Ambas son herramientas muy útiles para estudiar la interacción planta-microorganismo y para detectar y enumerar microorganismos en tiempo real *in situ* sobre y dentro de los tejidos de las plantas (Larrainzar *et al.*, 2005). Otras técnicas están basadas en métodos de detección y/o cuantificación del contenido de ácidos grasos en la membrana microbiana la cual es específica para cada uno de los diferentes grupos taxonómicos bacterianos (e.g., phospholipid fatty acid analysis y fatty acid metil ester analysis [FAME]).

Por otro lado, en los últimos años gracias a los nuevos métodos de genómica, proteómica y bioinformática, y la inclusión en las bases de datos de un gran número de secuencias de ADNr de distintos organismos en proyectos de 'barcoding', ha permitido que la información sobre la biodiversidad del suelo se haya visto incrementada exponencialmente hasta niveles difíciles de imaginar tan sólo hace unos años. En este sentido, una perspectiva relativamente nueva la constituyen los estudios basados en metagenómica, también llamada de comunidades genómicas, cuyo propósito es el estudio y análisis colectivo de genomas de comunidades microbianas, en lugar de las especies individuales presentes en ecosistemas complejos. Así, el metagenoma del suelo se define como el estudio, exploración y análisis funcional de los genomas colectivos presentes en una muestra de suelo (Riesenfeld *et al.*, 2004; van Elsas *et al.*, 2008). El metagenoma microbiano es la mayor reserva de genes en el ecosistema suelo y es esencial para el mantenimiento de los ciclos biológicos y procesos funcionales que tiene lugar en él. Este método permite el estudio y explotación de la diversidad metabólica y taxonómica de comunidades microbianas a un nivel de ecosistema (Simon y Rolf, 2009) y ha sido validado para la identificación de novedosos genes que codifican para la degradación de enzimas, resistencia a antibióticos (Riesenfeld *et al.*, 2004) y producción de éstos (Wang *et al.*, 2000).

Uno de los últimos avances tecnológicos en la metagenómica es la técnica de Pirosecuenciación 454 (Ronaghi *et al.*, 1996) la cual puede y debe abrir un nuevo campo de perspectivas en el estudio y avance en conocimiento del ecosistema rizosférico, así como de las interacciones planta-patógeno-microbiota rizosférica. Esta técnica, ha permitido comprobar que la diversidad de comunidades microbianas es varios órdenes de magnitud superior a la estimada previamente, así como identificar nuevos taxa de microorganismos no cultivables en ecosistemas complejos como aguas de océanos profundos, entre otros (e.g., Galand *et al.*, 2010; López-Bueno *et al.*, 2009; Pignatelli *et al.*, 2009; Tamames y Moya, 2008; Tamames *et al.*, 2010) y determinar patrones ecológicos globales a partir de datos genéticos masivos (Barberán y Casamayor, 2010).

La aplicación de metagenómica en Ecología Microbiana de suelos es muy reciente (e.g., Búee *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Lauber *et al.*, 2009; Roesch *et al.*, 2007b). Los estudios fundamentalmente han consistido en el escrutinio e identificación de las comunidades bacterianas y de hongos presentes en suelos naturales, forestales, agrícolas, supresivos a enfermedades causadas por patógenos que residen en el suelo (Boonham *et al.*, 2008; Van Elsas *et al.*, 2008) y en el efecto que factores físicoquímicos (pH), de manejo del suelo o presencia de contaminantes pueden tener en la estructura y diversidad de dichas comunidades (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Búee *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Lauber *et al.*, 2009; Roesch *et al.*, 2007b; van Elsas *et al.*, 2008).

La precisión de los análisis de la diversidad de comunidades bacterianas en la rizosfera mediante las técnicas cultivo-independiente ha permitido encontrar taxones bacterianos definidos que pueden estar comúnmente asociados a la rizosfera de las plantas o totalmente ausentes bajo muchas condiciones. Esto ha contribuido a entender las diferencias existentes entre el suelo circundante, la rizosfera y la dinámica de los diversos procesos que se llevan a cabo en ella, además de inferir que la predominancia de ciertos grupos está relacionada con la importancia que

podieran tener en la estructura funcional de la rizosfera (Ahn *et al.*, 2006; Brons y van Elsas, 2008).

En la actualidad, se ha considerado que es esencial utilizar un análisis polifásico, el cual integra estudios basados tanto en metodologías cultivo-dependientes como cultivo-independientes. Este análisis aborda diferentes aspectos de la diversidad microbiana que conduce a una evaluación más completa de la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que interactúan con las plantas en la rizosfera, obteniendo una mejor comprensión del funcionamiento de este ecosistema (Salvaudon *et al.*, 2008; Torsvik y Orveas, 2007).

I.4. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN LA RIZOSFERA Y ENDOSFERA DEL SISTEMA RADICAL DE LAS PLANTAS

I.4.1. Diversidad e importancia de las bacterias en la biosfera

Dentro de la amplia diversidad genética que presentan los microorganismos en diferentes medio ambientes, las bacterias conforman una gran fracción de esta diversidad constituyendo uno de los tres dominios en el árbol filogenético de la vida (Archaea, Bacteria y Eucaria) (Torsvik y Orveas, 2007; Woese, 1994). Las bacterias, como grupo, tienen una larga historia evolutiva, la cual les ha conferido la capacidad de habitar la mayor parte de los nichos ecológicos existentes, representando la mayor porción de biomasa sobre la tierra y consecuentemente convirtiéndose en componentes importantes en muchos procesos esenciales para la vida, como es el caso de los ciclos del azufre, carbono y nitrógeno.

La diversidad genética bacteriana se considera que no es estática, sino altamente dinámica, representada por la amplia complejidad a nivel de especie e intraespecífica de sus componentes, lo cual aunado a un ciclo de vida corto y alto porcentaje de multiplicación celular, les confiere una alta y

rápida capacidad de adaptación y respuesta a cambios ocurridos en el medio ambiente (Abby y Daubin., 2007; Coenye *et al.*, 2005; Gans *et al.*, 2005; Konstantinidis *et al.*, 2006; Roesch *et al.*, 2007a). En el medio ambiente, las bacterias se encuentran asociadas con otras poblaciones bacterianas de diferentes especies formando comunidades, que colonizan todo tipo de medio ambientes tanto terrestres, acuáticos, animales como plantas (Andreote *et al.*, 2009).

I.4.2. Interacción planta – bacteria en la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas en el sistema radical de las plantas

Las plantas proporcionan un medio ambiente específico y altamente dinámico para una amplia diversidad de comunidades microbianas que habitan naturalmente en el suelo. Estas comunidades han evolucionado a través del tiempo desarrollando una amplia gama de estrategias en diferentes grados y niveles de especialización que les permiten interactuar con las plantas de forma benéfica, neutral o dañina, y ésto ocupando diferentes nichos, ya sea colonizando el suelo influenciado por la raíz (rizosfera) o penetrando al interior de la planta colonizando los espacios intercelulares o tejidos vasculares (endosfera) (Haichar *et al.*, 2008).

Los resultados de numerosas investigaciones han demostrado que la composición de las comunidades microbianas asociadas a las plantas es altamente específica y que las interacciones que ocurren son el resultado de un reconocimiento recíproco entre ambos organismos. Consecuentemente, esta composición específica cumple un papel importante en el funcionamiento integral de procesos biológicos esenciales en el desarrollo y en la sanidad de las plantas (Andreote *et al.*, 2009; Compant *et al.*, 2009; Sorensen y Sessich, 2007).

La microflora del suelo representa la fuente primaria de las bacterias asociadas a las plantas y por lo tanto determinan en gran medida la estructura de las comunidades que alberga. Sin embargo, uno de los

factores en los cuales se fundamenta que la interacción entre las comunidades bacterianas y las plantas es altamente específica, son los exudados y depósitos de la raíz de las plantas (rizodeposición) como se expondrá en el siguiente apartado. Así, la relación específica y variación estructural de las comunidades bacterianas está determinada por la especie de la planta, estado de crecimiento, y otros factores bióticos y abióticos, permitiendo establecer diferencias en las poblaciones microbianas que colonizan una especie de planta en particular (Haichar *et al.*, 2008; Sorensen y Sessich, 2007).

La rizosfera ha sido definida como la zona de transición o el compartimento del suelo que está influenciado por la raíz de las plantas a través de los compuestos orgánicos y substratos liberados en forma de exudados por la raíz (Sorensen y Sessich, 2007). El micro ambiente que se forma en la rizosfera estimula la interacción planta-microorganismo con un alto grado de especificidad permitiendo la colonización y multiplicación de estos microorganismos en la rizosfera de las plantas.

Existen varias especies bacterianas que no solamente son capaces de colonizar la rizosfera de las plantas, sino que también pueden entrar y colonizar el tejido interno de las mismas (endosfera). El conocimiento de los microorganismos endofitos de las plantas se originó en las primeras investigaciones llevadas a cabo por Victor Galippe en 1887, quien postuló que ciertos microorganismos del suelo, mediante un proceso selectivo específico, podían penetrar el tejido de las plantas. Durante mucho tiempo el término endofito fue utilizado para referirse principalmente a hongos cuyo ciclo de vida lo llevaban a cabo dentro de los tejidos de las plantas. Posteriormente, el término fue definido de forma más precisa incluyendo hongos y bacterias, ya que las bacterias endofitas han sido habitualmente encontradas colonizando los tejidos internos de las plantas huésped estudiadas, estableciendo un amplio rango de diferentes interacciones incluyendo simbiosis, mutualismo, comensalismo o incluso parasitismo (Ryan *et al.*, 2008).

En la disciplina de la Agronomía, este concepto ha sido posteriormente ampliado y adecuado para que la definición incluya a todas aquellas bacterias que puedan ser aisladas de tejidos o de órganos de las plantas que han sido esterilizados superficialmente y cuya presencia no manifiesta un daño visible a la planta huésped (Hallmann *et al.*, 1997; Hardoim *et al.*, 2008).

La mayoría de los endofitos tiene su origen en la rizosfera, sin embargo algunos pueden ser transmitidos a través de semilla, material de propagación vegetativa, o provenir de la filosfera. Una de las evidencias que sustentan que la rizosfera es la fuente más importante de las bacterias endofitas es que una parte de sus poblaciones son similares en ambos nichos ecológicos (Ryan *et al.*, 2009). La secuencia de eventos en la colonización de los tejidos internos de la planta por endofitos es similar, al menos en las primeras fases, a la ocurrida con las bacterias de la rizosfera que colonizan las raíces de las plantas. Sin embargo, se asume que las plantas pueden funcionar como verdaderos filtros de las bacterias de la rizosfera, seleccionando aquellas poblaciones que son exitosamente competitivas como endofitos, y que están constituidas por miembros especializados de esos grupos de bacterias, cuyo ciclo de vida y función biológica dentro del tejido, se considera una forma de vida evolucionada de estas bacterias de la rizosfera.

Existe evidencia en la literatura de que durante este proceso de selección se llevan a cabo interacciones planta-microorganismo ecológicamente relevantes para ambas especies (Sorensen y Sessitch, 2007). Otras investigaciones han indicado que miembros del mismo género y especie de bacterias pueden ser encontrados en comunidades de la rizosfera y en comunidades endofíticas de la misma planta. Sin embargo, cada una de ellas contiene distintas subpoblaciones las cuales están seleccionadas y situadas para colonizar su respectivo nicho. El medio ambiente (principalmente del suelo) y factores genéticos (genotipo, estado de crecimiento y fisiológico de la planta, tipo de tejido, prácticas agrícolas, y exudados de la raíz) (van Overbeek y van Elsas, 2008) tienen influencia y

determinan significativamente la colonización endofítica de la raíz por bacterias (Bacilio-Jimenez *et al.*, 2003).

I.4.3. Importancia de los exudados del sistema radical como nicho ecológico de las comunidades bacterianas

Los exudados de las raíces representan la mayor fuente de carbono y energía para el crecimiento de las bacterias que colonizan la rizosfera y a su vez influenciarán en las poblaciones existentes en la endosfera. La cantidad, tipo y distribución de los diferentes compuestos de carbono secretados es lo que forma, sostiene y regula la estructura y dinámica poblacional de ésta, proporcionando un nicho ecológico altamente especializado para el crecimiento microbiano, permitiendo la competencia entre ellos por los nutrientes y consecuentemente llevándose a cabo una selección altamente específica por las plantas (Bais *et al.*, 2006).

Los componentes solubles de los exudados radicales más abundantes incluyen una gran variedad de compuestos monoméricos como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, así como ácidos carboxílicos (cutrato, malato, succinato y oxalato). Otros compuestos asociados a la rizodeposición son fenoles y sideróforos que facilitan la movilización y adquisición de minerales insolubles e iones inorgánicos que alteran las condiciones químicas y biológicas del micro ambiente de la raíz. La composición y abundancia de los exudados es considerada planta-específica, variando incluso entre especies estrechamente relacionadas genéticamente creciendo bajo las mismas condiciones (Czarnota *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2001; Warembourg *et al.*, 2003), entre cultivares, estado de desarrollo de la planta, parámetros del suelo como pH, textura, disponibilidad o limitación de nutrientes, cambios espaciales, temporales y fisiológicos de la raíz (Haichar *et al.*, 2008; Sorensen y Sessich, 2007), así como a la exposición e infección por organismos fitopatógenos (Sorensen y Sessich, 2007), reflejando todo ello la evolución y/o adaptación fisiológica

específica a las condiciones particulares del suelo como habitat (Hartmann *et al.*, 2009).

El proceso de flujo, movimiento y distribución de exudados en las raíces es conocido como rizodeposición y puede representar entre el 10 y 40% de los fotosintatos producidos por la planta (Sorensen y Sessich, 2007). Ésta interacción está considerada de acontecer en ambos sentidos, ya que mientras la actividad microbiana se incrementa en la rizosfera, los microorganismos pueden estimular la rizodeposición e incrementar la disponibilidad de exudados para su crecimiento (Compant *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2009; Kuzyakov *et al.*, 2003; Micallef *et al.*, 2009). Por lo tanto, se asume que diferentes suelos contienen diferente estructura y abundancia de microflora, y a partir de esa diversidad microbiana, las plantas a través de los exudados, seleccionan subpoblaciones bacterianas específicas para una función definida, los cuales colonizan posteriormente la rizosfera o la endosfera.

I.4.4. Diversidad estructural y funcional de las comunidades bacterianas en la rizosfera y endosfera

Las comunidades bacterianas que colonizan la rizosfera y la endosfera son de gran importancia ya que cumplen una amplia gama de funciones, muchas de las cuales, en la actualidad, aún están poco exploradas. Las diversas investigaciones llevadas a cabo en el sistema radical de las plantas han demostrado que ésta como nicho ecológico, alberga poblaciones bacterianas con una diversidad funcional enorme que pueden actuar como saprófitas, benéficas, así como patógenas (Buée *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2008; Salvaudon *et al.*, 2008; Sorensen y Sessich, 2007). Así ha sido argumentado que grupos de microorganismos específicos que colonizan la rizosfera y la endosfera de la planta producen y secretan fitohormonas, como auxinas y ácido-3-indolacético (AIA) (fitoestimuladores) que estimulan y modulan el crecimiento de las plantas

(e.g., especies de *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*) y que además tienen una participación activa en la degradación de compuestos tóxicos y contaminantes en el suelo y raíz de las plantas (rizoremediadores) (Bais *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2010; Haichar *et al.*, 2008; Hallmann *et al.*, 1997; Kamilova *et al.*, 2008; Lodewyckx *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2010; Lugtenmberg y Kamilova, 2009; Sun *et al.*, 2008).

Dentro de las funciones concretas de las comunidades bacterianas de la rizosfera se encuentran las que intervienen de forma activa en el desarrollo de los ciclos de nutrientes de la planta como el ciclo del nitrógeno por mineralización, nitrificación y desnitrificación, asimilación de fósforo, etc. (Zhang *et al.*, 2009), incrementan la solubilidad y disponibilidad de otros nutrientes minerales, además de desempeñar un papel importante en el decremento en la toxicidad del suelo (bioremedación) por metales pesados tales como mercurio (Hg), plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni) zinc (Zn) y compuestos halogenados (Francis *et al.*, 2010).

Al igual que las bacterias de la rizosfera, las poblaciones endofitas contienen representantes microbianos que se caracterizan por la producción de un amplio rango de sustancias con potencial uso en la agricultura, medicina e industria (Compant *et al.*, 2005; Compant *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2008; Sorensen y Sessitch, 2007). Estas bacterias promueven el crecimiento de las plantas por mecanismos muy similares a las de la rizosfera y que incluyen solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético, y producción de sideróforos entre otros. Otros efectos beneficiosos para la planta que han sido atribuidos concretamente a la actividad de los endofitos tiene que ver con regulación osmótica, y modificación morfológica de la raíz (Ryan *et al.*, 2008).

En los últimos años, otras líneas de investigación han enfocado sus estudios en el potencial de las comunidades microbianas de la rizosfera y la endosfera de diversas especies de plantas como productoras de

substancias con perspectivas de utilización en la industria, medicina y agricultura (Compant *et al.*, 2005, 2009; Ryan *et al.*, 2008; Sorensen y Sessitch, 2007). Por otro lado, ha sido demostrado como estas poblaciones bacterianas forman parte y llevan a cabo procesos esenciales relacionados con la patogénesis y defensa de la planta, mediante señalizaciones moleculares que inducen la producción de antibióticos y otros metabolitos esenciales para desencadenar mecanismos de defensa en el tejido de la planta y supresión de patógenos del suelo (Kent y Triplett, 2002).

El resultado de numerosas investigaciones sobre la estructura de las comunidades bacterianas del sistema radical revelan que existen grandes diferencias en la diversidad y abundancia de grupos y especies bacterianas predominantes según la especie de planta en estudio (e.g., Chelius y Triplett, 2001; Fillion *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Mariley y Aragno, 1999; Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, diversos estudios han argumentado que las bacterias encontradas en la rizosfera de diferentes especies de plantas son predominantemente miembros de los grupos α y β proteobacteria, principalmente familia rhizobiaceae, y miembros del complejo de especies de *Burkholderia* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., así como *Actinobacteria* (e.g., Chelius y Triplett, 2001; Coenye *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 2008; Kaiser *et al.*, 2001; Marilley y Aragno, 1999; Schallmach *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2007).

Finalmente, hay que tener en cuenta que las comunidades bacterianas en el sistema radical no son estáticas, sino altamente dinámicas, presentando fluctuaciones en el tiempo en diferentes zonas de la raíz. En los últimos años, se ha determinado la influencia de factores tanto bióticos como abióticos en la estructura de las comunidades bacterianas (Tabla I.1) demostrándose que la rizosfera es un nicho altamente dinámico, donde existen decenas de factores que influyen la composición bacteriana de ésta (Buée *et al.*, 2009; Raaijmakers *et al.*, 2009). En el futuro, uno de los principales retos de la Ecología Microbiana de la rizosfera radicarán en poder manejar estos factores a favor del desarrollo de una(s) comunidad(es) bacteriana(s) concreta(s).

Tabla I.1. Influencia de factores bióticos y abióticos en las comunidades microbianas de la rizosfera y endosfera de las plantas

Factores	Referencia
<u>Bióticos</u>	
Especie de planta	Appuhn y Jorgensen, (2006), de la Fuente <i>et al.</i> (2006); Grayston (1998), Mazzola <i>et al.</i> (2004), Miethling <i>et al.</i> (2000), Smalla <i>et al.</i> (2001), Weisskopf <i>et al.</i> (2008)
Genotipo y/o cultivar	Jamalil <i>et al.</i> (2009), Knauth (2005), Landa <i>et al.</i> (2002); 2006), Mazzola y Gu (2002), Meredith <i>et al.</i> (2009), Van Overbeek y van Elsas (2008)
Ecotipos	Meredith <i>et al.</i> (2009), Micallef <i>et al.</i> (2009)
Plantas transgénicas	Becker <i>et al.</i> (2008), Fillion (2008), Oger <i>et al.</i> (2000), Rasche <i>et al.</i> (2006), Raubuch <i>et al.</i> (2007)
Etapas de desarrollo de la planta	Gomes <i>et al.</i> (2001), Herschkovitz <i>et al.</i> (2005)
Patrones porta injerto	Rumberger <i>et al.</i> (2004; 2007)
Secreción de exudados radicales	Broeckling <i>et al.</i> (2008), Mazzola (2004), Meredith (2009), Micallef <i>et al.</i> (2009), Rudrappa (2008a)
Compuestos biocidas exudados por la raíz	Rumberger y Marschner (2003)
Arquitectura de la raíz	Cardon y Gage (2006), Hawes <i>et al.</i> (2000; 2003), Loudet <i>et al.</i> (2005), Meredith <i>et al.</i> (2009), Vicre <i>et al.</i> (2005).
Rotación de cultivos	Alvey <i>et al.</i> (2003), Lupwayi <i>et al.</i> (1998)
Co-inoculación con agentes de biocontrol	Jamali <i>et al.</i> (2009)
Infecciones de la planta por patógenos	Rudrappa <i>et al.</i> (2008b), Rumberger <i>et al.</i> (2007)
Plantas leñosas y herbáceas	DeLong <i>et al.</i> (2002), Marschner <i>et al.</i> (2001), Rumberger <i>et al.</i> (2004)
<u>Abióticos</u>	
Tipo de suelo	Buyer <i>et al.</i> (1999), Marschner <i>et al.</i> (2001), Ridder-Duine <i>et al.</i> (2005) Singh <i>et al.</i> (2007)
Laboreo, barbecho del suelo	Höflich <i>et al.</i> (1999), Lupwayi <i>et al.</i> (1998)
Estación del año	Smalla <i>et al.</i> (2001)
Enmiendas orgánicas (compost)	Inbar <i>et al.</i> (2005)
Riego con aguas residuales	Oved <i>et al.</i> (2001)
Características físico-químicas del suelo	Garveba <i>et al.</i> (2004a)
Uso del suelo	Dilly <i>et al.</i> (2003); Grayston <i>et al.</i> (2004), Kuske <i>et al.</i> (2002)
Sistemas de manejo agrícola	Araújo <i>et al.</i> (2007), Esperschütz <i>et al.</i> (2007), Fließbach <i>et al.</i> (2007), Höflich <i>et al.</i> (1999), Wu <i>et al.</i> (2008)

Adaptado de Buée *et al.* (2009).

I.4.5. Perspectivas y direcciones futuras de la Ecología Microbiana del sistema radical de las plantas

Durante los últimos 30 años en el área de la Ecología Microbiana se ha generado un tremendo progreso en entender el proceso de colonización de raíces por las comunidades de microorganismos residentes en el suelo, así como en caracterizar los factores bióticos y abióticos que afectan dicha colonización, y la complejidad de interacciones que ocurren en ese medio ambiente. Sin embargo, muchas líneas de investigación deberán continuar generando información y otras nuevas tendrán que desarrollarse aún para contestar a muchos interrogantes sobre la interacción planta-microorganismo en la rizosfera.

Así, se han propuesto un gran número de líneas de investigación para poder profundizar y entender los principios que rigen o delimitan la estructura de las comunidades bacterianas en el suelo y en la rizosfera. Estas líneas sugieren la necesidad de generar mayor información sobre la respuesta específica de la interacción planta-microorganismo a cambios del medio ambiente; profundizar en el estudio del papel de la biodiversidad de especies y/o cultivares de la planta huésped como reservorio de especies microbianas con potencial en la agricultura, industria farmacéutica y alimenticia; el estudio del proceso de colonización de las bacterias estimuladas por exudados específicos de las raíces de las plantas, así como los mecanismos por los cuales ciertas bacterias son capaces de regular el metabolismo de la planta en su beneficio.

Dentro de este contexto, el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo-independiente podrían en el futuro revelar más información sobre los microorganismos que aun no se han podido cultivar en el laboratorio. El análisis de genomas de microorganismos ya secuenciados o en proceso, la caracterización de genes aún desconocidos y la identificación de genes expresados durante la colonización ayudaría a un mejor entendimiento sobre el proceso de colonización *per se* y sobre la interacción de los microorganismos beneficiosos con los patógenos de plantas en el medio

ambiente de la rizosfera. Además, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de bacterias de la rizosfera y endosfera, es considerada un aspecto clave para identificar los genes que manejan la colonización y establecimiento de las interacciones microorganismo-planta. En este sentido existen varios Proyectos en los que se está secuenciando el genoma completo de varias rizobacterias que se han demostrado efectivas como agentes de **control de enfermedades** (D.M. Weller, comunicación personal). Paralelamente, una prometedora área de investigación es el desarrollo de rizobacterias y endofitos que puedan promover la producción sostenible de biomasa y energía y estrategias de fitoremediación de la contaminación de suelos. Finalmente, el principal reto de la Ecología Microbiana será el integrar todo el conocimiento y enfocarlo al manejo de los recursos microbianos a un nivel de comunidades globales, cuyo objetivo principal es manejar apropiadamente los complejos ecosistemas microbianos.

I.5. CONTROL DE ENFERMEDADES Y ECOLOGÍA MICROBIANA

I.5.1. Control de enfermedades de las plantas

Las plagas, los patógenos y las malas hierbas causan la pérdida de más del 40 % del suministro mundial de alimentos (Oerke y Dehne, 2004) y concretamente, las enfermedades de las plantas son responsables de una pérdida media anual de cosecha del 12,6% de la cosecha alcanzable y 13,3% del valor monetario de ésta, a la cual debe sumarse un 10% de pérdida postcosecha; y todo ello a pesar de que en los cultivos evaluados se habían llevado a cabo prácticas de control frente a dichas enfermedades (Oerke y Dehne, 2004).

La aparición de las enfermedades en las plantas, son consecuencia de procesos interactivos complejos entre un agente causal primario (el patógeno) y una planta susceptible en el marco de un ambiente adecuado.

Las enfermedades son un componente importante de la producción agrícola porque tienen la capacidad de reducir significativamente (e.g., son *Factores Reductores*) el rendimiento potencial de los cultivos, o el rendimiento que puede alcanzarse cuando los cultivos se desarrollan en condiciones de disponibilidad subóptima de algunos *Factores limitantes* del crecimiento vegetal (e.g., agua, nutrientes, etc.). En términos generales, la magnitud de dicha reducción es determinada tanto por la naturaleza y etiología de la enfermedad como por la fisiología y ecología del cultivo en cuestión, el potencial genético de la variedad, etc. entre otros. (Jiménez-Díaz *et al*, 1998; Rabbinge, 1993). Las estrategias de manejo de las enfermedades en todo el mundo están fundamentadas principalmente en el uso de resistencia genética en las plantas y la aplicación de materias químicas activas contra los patógenos; sin embargo, el gran limitante es que no existen fuentes de resistencia contra todas las enfermedades en plantas, además de que los programas de mejora genética para la búsqueda de resistencia conllevan períodos largos de investigación. Adicionalmente, el uso de formulaciones químicas en la agricultura cada vez está más restringido por la continua legislación que prohíbe su uso en muchos países, en la actualidad, por el impacto negativo en el medio ambiente y por la poca aceptación de los consumidores en los mercados comerciales.

Estas circunstancias han propiciado la necesidad de buscar alternativas de manejo para el control de enfermedades. Es por esta razón que en los últimos años, las comunidades bacterianas han sido motivo de intensa investigación en el área de la agronomía, ya que pueden constituir una alternativa de control de enfermedades en los sistemas de manejo como fuente de ACBs de agentes fitopatógenos basados en su potencial para desarrollar e inducir diferentes mecanismos de control de enfermedades y que directa o indirectamente promuevan la sanidad y crecimiento de las plantas sin causar efectos negativos en el medio ambiente.

I.5.2. Definición de Control Biológico

En 1974, Baker y Cook definieron el control biológico como "la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado de actividad o dormancia, mediante uno o más organismos, y lograda de forma natural mediante la manipulación del ambiente, el huésped, el antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas". Esta definición fue posteriormente abreviada como: "Control Biológico es la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad productora de enfermedad de un patógeno llevada a cabo por uno o más organismos diferentes al hombre" (Cook y Baker, 1983). La "actividad productora de enfermedad" incluye el crecimiento, infectividad, agresividad, virulencia, y otras características del patógeno, o de los procesos que determinan la infección, el desarrollo de síntomas y la reproducción.

El objetivo del control biológico de los patógenos de suelo de las plantas es la reducción de la enfermedad. Esto puede conseguirse mediante varios métodos (Cook y Baker, 1983): (i) Reducción del potencial de inóculo del patógeno a través de la disminución de la viabilidad, producción o liberación de propágulos viables, o por la disminución del crecimiento del micelio; (ii) Reducción de la infección del huésped por el patógeno y; (iii) Reducción de la severidad del ataque por el patógeno.

El control biológico es la culminación de un complejo de relaciones en las que intervienen el patógeno, la planta huésped, el ACB o antagonista y el medio ambiente (Weller, 1988). La principal restricción para comprender y, por lo tanto, poder utilizar ACBs de forma comercial en el control de patógenos de plantas, es la falta de conocimiento de la ecología y fisiología de estos sistemas *in situ* (Edwards *et al.*, 1994). Por este motivo, a la hora de estudiar algún sistema en el que opera, o se quiere que opere un mecanismo de control biológico, habrá que tener en cuenta todos los elementos que intervienen y sus posibles interacciones. Los varios componentes que deben ser tenidos en cuenta en cualquier sistema de

control biológico de un patógeno de suelo incluyen: los microorganismos del suelo, el medio ambiente existente en el suelo, la raíz y la rizosfera, la resistencia de la planta al patógeno, los mecanismos de antagonismo, el inóculo del patógeno existente en el suelo, y todas las interacciones existentes entre el suelo, el patógeno, la planta, y los ACBs (Cook, 1990).

La potencialidad de los microorganismos para actuar como ACBs, ya sean indígenas o introducidos artificialmente, viene determinada por la mayor cantidad, crecimiento y actividad metabólica de éstos en la proximidad de las zonas de infección radical, a su vez fuertemente influidas por la cantidad y calidad de nutrientes orgánicos y minerales liberados por la raíz y disponibles en la rizosfera de la planta (efecto rizosférico) (Weller *et al.*, 2007). Los agentes de control biológico deben estar adaptados ecológicamente a sobrevivir en el ambiente rizosférico donde deben actuar y llegar a establecerse en él, colonizando de forma efectiva (alcanzando poblaciones suficientemente altas y metabólicamente activas en el tiempo para controlar al patógeno diana) los nichos donde deben ejercer su acción, compitiendo de forma satisfactoria por los recursos limitantes existentes en el suelo y en la rizosfera (Weller *et al.*, 2007). Ello les permitirá realizar su función final de suprimir al patógeno diana dentro de las condiciones particulares del ecosistema concreto donde se apliquen, interaccionando con todos los componentes de éste.

I.5.3. Agentes de control biológico (ACBs) en la agricultura actual

Los avances significativos que se han producido durante los últimos 20 años sobre la caracterización, ecología y modo de acción de una diversidad de ACBs, y el énfasis en el uso preferente de estrategias no químicas en la lucha contra las enfermedades de los cultivos, puede haber favorecido la percepción de que su control biológico es fácil y de eficiencia consistente. No obstante, son numerosos los casos que alertan de la falta de consistencia y variabilidad en los resultados de control biológico. Esto

es debido a la influencia de una variedad de factores que afectan a los patosistemas (e.g., densidad del inóculo y virulencia del patógeno, genotipo del cultivar, planta huésped, temperatura, etc.) y de las complejas interacciones que tienen lugar entre el patógeno, la planta, el ACB y el ambiente (Landa *et al.*, 2001).

Para que el control biológico llegue a ser un componente útil de un Sistema de Control Integrado de Enfermedades es necesario superar limitaciones en nuestro conocimiento a través de un incremento de la investigación en determinadas áreas: (i) El conocimiento exacto de las poblaciones del patógeno presentes en el campo (niveles y diversidad genética y patogénica), así como los niveles de daño a partir de los cuales el patógeno puede causar pérdidas económicas; (ii) El conocimiento más completo acerca de parámetros ecológicos importantes para la producción del cultivo, la eficiencia y la supervivencia de los ACBs; (iii) La identificación, y desarrollo (mediante ingeniería genética) de nuevos ACBs para el control de enfermedades de plantas y; (iv) El conocimiento de la ecología y biología del ACBs, patógeno y planta huésped que puedan ayudar a explotar los puntos de debilidad o de fuerza de estos organismos para incrementar el control biológico. Similarmente, el conocimiento de las condiciones físicas, biológicas, y ecológicas necesarias para el éxito del control biológico permitirían la optimización de estas condiciones para obtener los mejores niveles de control (Landa, 1999; Weller, 2007).

Actualmente, con las nuevas tecnologías moleculares existentes, se han podido realizar investigaciones detalladas mediante las cuales se han identificado directamente ACBs efectivos contra patógenos diana mediante selección asistida, seleccionar cepas con afinidad a un cultivo en particular o a cultivares de éste, y desarrollar y/o explotar suelos naturalmente supresivos a un patógeno específico, determinar los factores bióticos y abióticos que afectan la colonización o eficacia de control biológico, o los genes involucrados en la competencia y supresión de los agentes fitopatógenos residentes en el suelo (e.g., Landa *et al.*, 2001; 2002; 2003; 2004; Weller, 2007).

Sin embargo, uno de los grandes retos en la actualidad sigue siendo el desarrollar la tecnología para la óptima incorporación de estos ACBs en el campo en el momento adecuado y de forma duradera, así como poder desarrollar nuevas formulaciones comerciales con alta calidad, y viabilidad y a un precio asequible para el agricultor. A pesar de que algunos productos son prometedores para su aplicación, esta ruta debe ser mucho más desarrollada y aplicada en beneficio de una agricultura sostenible.

Finalmente, el éxito en el uso eficiente de los ACBs aconseja que se les conciba como partes integrantes de programas de Manejo Integrado de Enfermedades. Esto requiere que se valoren diferentes estrategias para su aplicación en razón de la duración temporal del control (e.g., que requieran aplicaciones ocasionales; o repetidas como los fungicidas protectores) (Cook, 1993); así como que su empleo se acomode a las particularidades de cada patosistema y ambiente y su adecuación a la combinación con otras medidas de control (Landa *et al.*, 2003; 2004).

I.5.4. Mecanismos de control biológico en la rizosfera y endosfera de las plantas

Las rizobacterias son uno de los grupos más importantes entre los numerosos microorganismos que pueden actuar como ACBs contra hongos fitopatógenos residentes en el suelo. Son competidores muy eficaces en el suelo por su capacidad de superar en número y cantidad a cualquier otro organismo edáfico, por su habilidad para utilizar diferentes formas de nutrientes bajo condiciones diversas, y por su facilidad para multiplicarse con rapidez como respuesta a los nutrientes. Respecto a las poblaciones endofitas, una de las potenciales ventajas de los aislados bacterianos endofitos como ACBs es que los nichos endofíticos ofrecen protección del medio ambiente para aquellas bacterias que pueden colonizar y establecerse en los tejidos internos de las plantas lo cual beneficia el establecimiento y permanencia de los potenciales ACBs. Por

otra parte, diversas investigaciones han revelado que las bacterias endofitas colonizan nichos ecológicos similares a los de los agentes fitopatógenos; esto hace que se consideren como más apropiados para su uso en control biológico (Ryan *et al.*, 2008). Así, numerosos estudios han demostrado la capacidad de ciertos endofitos para controlar fitopatógenos, insectos (Azevedo *et al.*, 2000), y nematodos (Hallmann *et al.*, 1997; 1998).

El control biológico de un microorganismo puede ejercerse: i) De manera directa a través de múltiples mecanismos como la producción de compuestos microbianos (antibiosis) que inhiben el crecimiento de otros o los mata (Berg, *et al.*, 2005), producción de fitohormonas, exoenzimas, competencia por nutrientes (e.g., competencia por iones de hierro por la producción de sideróforos), competencia por nichos ecológicos, sitios de colonización en los tejidos de plantas, etc., o ya sea por la inhibición de factores que promueven la germinación del patógeno y el proceso de patogenicidad, y también por interferencia de señalización (interferencia en la señal de las moléculas Quorum Sensing de AHLs homoserine lactones) (Lugtemberg y Kamilova, 2009) y ii) De manera indirecta mediante la inducción de un sistema de respuestas de defensa en la planta conocida como Resistencia Sistémica Inducida (ISR, siglas en inglés), y/o promoción del crecimiento en las plantas. Estas últimas relacionadas principalmente a un grupo de bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR). Sin embargo se considera que, en la mayoría de los casos, la exitosa supresión de una enfermedad resulta de la implementación simultánea de múltiples mecanismos por uno o varios ACBs (Beattie, 2006, Sorensen y Sessitch, 2007).

Existen varios *metabolitos secundarios* producidos por rizobacterias que han sido implicados en su capacidad de control biológico. Estos metabolitos secundarios le confieren a las rizobacterias una ventaja competitiva y selectiva contra otros microorganismos además de contribuir a su eficiencia competitiva por la colonización de sitios específicos de la raíz, entre los que merecen citarse:

Sideróforos: Los microorganismos que producen sideróforos para extraer en forma más eficiente los iones de hierro del medio ambiente que sus competidores los hace antagonistas de éstos. Muchos aislados de *Pseudomonas* fluorescentes producen sideróforos tales como pyochelina, pyoverdina, pseudobactina y ferribactina los cuales han demostrado ser altamente eficientes para la adquisición de hierro el cual es un micro nutriente esencial para el desarrollo de los microorganismos y como consecuencia de esta interacción poder ejercer así su capacidad de control biológico contra una amplia gama de patógenos. Otros géneros como *Serratia* contienen especies bacterianas que se caracterizan por producir enterobactina y aerobactina, ejerciendo una acción antagonista contra importantes patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Raaijmakers *et al.*, 1995).

Exoenzimas líticas y Antibióticos: *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Burkholderia* frecuentemente encontradas colonizando la rizosfera, contienen especies en las que comúnmente su antagonismo está asociado a la producción de enzimas que hidrolizan la pared celular como quitinasas, β -glucanasas, y celulasas, las cuales pueden antagonizar y reducir el crecimiento de los agentes fitopatógenos presentes en la rizosfera. Por otra parte, una amplia gama de bacterias, principalmente bacterias PGPR secretan antibióticos los cuales son particularmente relevantes para la colonización de rizosfera y rizoplano, entre estas moléculas destacan: fenazinas, 2-4 diacetilfluoroglucinol (DAPG), cianuro de hidrógeno (HCN), oomycina A, pioluteorina, pirrolnitrina, thiotropicina, tropolone, etc., así como muchas otras como lipopeptidos cíclicos, rhamnolípidos, olygomicina A, kanosamine, zwittermicina A y xanthobaccina. Recientemente, se han encontrado bacterias que producen nuevos compuestos antibióticos como el ácido-D-glucónico y 2-hexyl-5-propyl-resorcinol y otros compuestos volátiles como el 2,3-butaneidol y lipopéptidos biosurfactantes (Compant *et al.*, 2009; Lugtemberg y Kamilova, 2009). Algunas bacterias pueden secretar uno o mas de esos metabolitos permitiéndole ser mas competitivas con la microflora natural

residente en la rizosfera y rizoplano de la planta huésped (Compant *et al.*, 2009). Por ejemplo, la producción de lipopéptidos cíclicos, como la viscosinamida, recientemente ha llamado la atención como agentes humectantes para facilitar la colonización en *Pseudomonas fluorescens* en algunos cultivos y su papel en la reducción de la enfermedad (Sorensen y Sessitch, 2007).

Producción de fitohormonas: Muchas especies bacterianas utilizadas en el control biológico tienen la capacidad de producir fitohormonas e.g., ácido giberélico, citoquininas y ácido indolacético (IAA); esta última es una de las más comúnmente asociadas a muchas especies de bacterias de la rizosfera y endosfera pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, y *Azospirillum*. La producción del IAA se activa por mecanismos de señalización en los cuales están involucrados los exudados radicales de la planta (Sorensen y Sessitch, 2007).

La competencia ocurre cuando dos o más organismos requieren los mismos recursos para su actividad, y el uso de éstos por uno de los organismos reduce la cantidad disponible para el otro (Campbell, 1989; Lewis *et al.*, 1989). Existen varias formas de competencia por las que las rizobacterias pueden desarrollar su capacidad de control biológico:

Competición por nutrientes: Ocurre principalmente por nutrientes esenciales, como C y N, durante la colonización del tejido. En este lugar de colonización, el agente de control biológico puede utilizar un substrato de crecimiento esencial más eficientemente que el patógeno lo cual origina que este sea desplazado.

Ellis y colaboradores (2000) demostraron que durante la interacción entre *Pseudomonas putida* y el patógeno del suelo *Pythium* spp. la competencia por exudados esenciales en la raíz de guisante, que actuaban estimulando la germinación de esporangios del patógeno, resultó en la protección de la planta contra ese hongo, confirmando posteriormente que el perfil catabólico de *P. putida* y *Pythium* son similares.

Competición por espacio: Se produce cuando un microorganismo excluye a otro de la ocupación de una superficie en el microhábitat nicho.

Este fenómeno puede ser importante en el caso de patógenos que penetran por heridas, o que necesitan determinadas densidades de inóculo inicial para iniciar el proceso de penetración. En este caso es de gran interés la velocidad de crecimiento de cada componente de la interacción, el agente de control biológico y el patógeno (Baker, 1968; Baker y Cook, 1974). Cuando un agente de control biológico introducido en el suelo o en la rizosfera de la planta alcanza niveles de población suficientemente grandes y ocupa un nicho ecológico que se solapa o abarca el del patógeno diana, esto puede dar lugar a una protección mediante la prevención del establecimiento del patógeno sobre la superficie de la raíz (Landa *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2007).

Existen bastantes casos documentados de *Resistencia Sistémica Inducida (ISR)* mediada por rizobacterias: La ISR se ha demostrado actuar en la interacción de *Pseudomonas aeuroginosa* contra *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* en judía; *Pseudomonas fluorescens* en la marchitez vascular en clavel; *Serratia marcescens* en la interacción contra *Fusarium oxysporum* y *Erwinia tracheiphila* en calabacín (Van Loon *et al.*, 1998). Para que ocurra la inducción de ISR en la planta, se han encontrado involucradas señalizaciones importantes basadas en la producción de ciertos lipopolisacáridos y sideróforos en bacterias gram-negativas, y por parte de la planta la producción y regulación de bajas concentraciones de etileno en el tejido, lo cual se considera actúa como una señalización a larga distancia. Otras investigaciones han revelado que el fenómeno del quórum sensing puede estar involucrado en la inducción de ISR en plantas, tal como fue demostrado con el modelo de interacción con *Serratia liquefaciens* en plantas de tomate contra *Alternaria alternata* (Sorensen y Sessitch, 2007).

I.5.5. Métodos de estudio en la interacción antagonista-patógeno en la rizosfera y endosfera

Las comunidades bacterianas concretamente de la rizosfera y endosfera han sido unas de la más estudiadas tanto por su diversidad como para su uso como como ACBs de patógenos. El control biológico exitoso de las enfermedades en plantas no se fundamenta únicamente en la supresión de los agentes fitopatógenos por medio de la manipulación de microorganismos residentes o introducidos, sino que implica el desarrollo de conocimiento de todo un proceso que involucra no solamente el agente microbiano de control, el patógeno y la planta sino también los complejos sistemas de interacción y la influencia de los factores bióticos y abióticos entre la microflora existente y las plantas (Compant *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2010; Landa *et al.*, 2001; 2004; Lugtemberg y Kamilova, 2009). Este hecho enfatiza la importancia de tener un conocimiento más profundo de los factores que influyen estas interacciones en cada patosistema para poder desarrollar estrategias de manejo sostenible de las enfermedades mediante el uso de microorganismos como agentes de control biológico en la agricultura (Rudrappa *et al.*, 2008a).

Las técnicas de cultivo-dependiente son en la actualidad uno de los métodos más utilizados para el estudio de las interacciones entre bacterias de la rizosfera antagonistas y agentes fitopatógenos. Esto permite, mediante pruebas de cultivo dual en placa, evaluar y proyectar, un gran número de potenciales aislados antagonistas contra diferentes fitopatógenos. La gran ventaja que ofrece este método es la de poder manipular los aislados bacterianos antagonistas para su experimentación y uso en condiciones *in situ*. Sin embargo, en la actualidad la tecnología de cultivo-independiente ha tenido un amplio desarrollo en el estudio de potenciales antagonistas, por la utilización de métodos moleculares que facilitan la selección asistida de rizobacterias (De la Fuente *et al.*, 2006; Delaney *et al.*, 2001; Mavrodi *et al.*, 2001, 2007; McSpadden-Gardener *et al.*, 2001) ya que tienen como diana genes esenciales en la biosíntesis de

los antibióticos más frecuentemente producidos en la rizosfera así como de nuevas moléculas con una importante función en la interacción microorganismo-planta (Gross *et al.*, 2007). El desarrollo de iniciadores específicos a ciertos genes diana involucrados en el proceso de antagonismo son una herramienta muy útil en el análisis de la interacción antagonista-patógeno, e.g., la búsqueda de poblaciones específicas de *Pseudomonas* (Garveba *et al.*, 2004b) y Actinobacterias (Heuer *et al.*, 2002). Especies de *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Serratia* que producen el antibiótico pyrrolnitrina mediante el uso de iniciadores específicos para la detección del gen *pmnD* (Garveba, *et al.*, 2004b; Kirner *et al.*, 1998); la detección del gen *phlD* altamente conservado en poblaciones de *Pseudomonas* para la biosíntesis de 2,4 diacetilfluoroglucinol (DAPG) que permite detectar y cuantificar poblaciones productoras de DAPG en la rizosfera (De La Fuente *et al.*, 2006; Landa *et al.*, 2002; 2003; Mavrodi *et al.*, 2007, McSpadden *et al.*, 2001; Picard *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 1997, 1999).

I.5.6. Importancia de *Pseudomonas* y *Bacillus* spp. como agentes de control biológico (ACBs)

En los últimos años, uno de los mayores desarrollos en el área del control biológico, sin lugar a dudas, han sido las investigaciones realizadas sobre rizobacterias por su mayor versatilidad como agentes de biocontrol y promotores del crecimiento de plantas. Las características que debe reunir una rizobacteria para aumentar su capacidad de establecimiento y/o supervivencia, cuando se introduce en la rizosfera de un cultivo para que actúe como agente de control biológico, incluyen: Una alta velocidad de crecimiento en relación a otros microorganismos autóctonos, resistencia ante condiciones adversas o falta de nutrientes, movilidad celular, producción de sustancias que permitan su fijación a las raíces de las plantas, y producción de antibióticos (Mazzola *et al.*, 1992). *Pseudomonas*

y *Bacillus* son géneros de bacterias que poseen muchas de estas características por lo que potencialmente las han hecho ser los dos géneros más estudiados y eficaces como ACBs contra hongos fitopatógenos en la rizosfera.

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son habitantes comunes del suelo, tejidos de las plantas y especialmente de la rizosfera de éstas. Las *Pseudomonas* fluorescentes son el grupo más estudiado dentro de este género, y comprende especies fitopatógenas y no fitopatógenas.

Las especies del género *Pseudomonas* han sido objeto de estudio en múltiples interacciones con diferentes especies de plantas y cultivos agrícolas. Se caracterizan por ser bacterias aeróbicas, gram-negativas, cosmopolitas en suelos agrícolas y de alta especialización y capacidad de adaptación para colonizar la rizosfera. Poseen atributos que las hacen ser una de las rizobacterias más estudiadas para actuar como ACB y promotores de crecimiento como tener requerimientos nutricionales muy simples y de crecer rápidamente en condiciones *in vitro*, lo cual facilita su producción en forma masiva, respuesta rápida a exudados de raíces y semillas, alta capacidad de colonizar y multiplicarse en la rizosfera y dentro de los tejidos como endofitas, producir un amplio espectro de metabolitos de relevancia en la interacción microorganismo-planta (e.g., antibióticos, sideróforos, sustancias volátiles y promotoras del crecimiento, etc.), capacidad de inducir resistencia sistémica en plantas, competir agresivamente con otros microorganismos y tener alta adaptación a diferentes medio ambientes. Adicionalmente, diversas especies de *Pseudomonas* son responsables en gran medida de la condición supresiva de suelos de todo el mundo para una amplia gama de patógenos (Gu y Mazzola, 2003; Lottmann *et al.*, 1999; Weller, 2007).

Por otro lado, un gran número de especies de *Bacillus* se han utilizado como ACBs en diversas especies de plantas para investigar su capacidad de controlar enfermedades de cultivos. Este grupo ofrece varias ventajas sobre otros ACBs estudiados, son considerados microorganismos seguros

para la salud de humanos y medio ambiente, son habitantes naturales del suelo y en diversos medio ambientes como la rizosfera, endosfera, o filosfera e incluso semilla (Correa *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2006; 2007), poseen un alto grado de diversidad metabólica, los cuales son ecológicamente relevantes ya que les permite habitar diversos nichos en diferentes agroecosistemas (McSpadden-Gardener, 2004; Vargas-Ayala *et al.*, 2004). Como ACBs son altamente competitivos y estables (Haddad *et al.*, 2009; Kinkel, 1997; Romero *et al.*, 2004), con capacidad de sintetizar una amplia gama de sustancias potencialmente útiles en la agricultura e industria (Collins y Jacobsen, 2003; Emmert y Handelsman, 1999; Liu *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2006; 2007; Stein, 2005). Su alta actividad y capacidad como ACBs es expresado principalmente a través de tres mecanismos ecológicos: i) antagonismo mediante la producción de múltiples compuestos, ii) promoción del crecimiento y nutrición de la planta huésped y iii) estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas (Choudhary y Johri, 2009). Actualmente, un gran número de investigaciones se han desarrollado con diversas especies de *Bacillus* enfocadas principalmente en el estudio de los múltiples factores metabólicos y fisiológicos que han contribuido en la consideración de *Bacillus* spp. como uno de los potenciales ACBs más prometedores y efectivos destacando los estudios: i) de control hacia varios patógenos de cultivos de importancia económica mediante el antagonismo por la producción de antibióticos, (Bais *et al.*, 2004; Kinsinger *et al.*, 2003; Liu, *et al.*, 2009; Mizumoto y Shoda, 2007; Nagórska *et al.*, 2007; Ongena y Jacques, 2007; Pinchuk *et al.*, 2002; Sari *et al.*, 2006; 2007; Yu *et al.*, 2002) ii) aplicación de éstos tanto en suelo como en partes aéreas de las plantas e igualando niveles de protección con los obtenidos con el uso de fungicidas (Bargabus *et al.*, 2002; 2004; Cazorla *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2009), iii) de producción de antibióticos *in vivo* en biofilms creciendo directamente en la rizosfera de plantas (Kinsella *et al.*, 2009), producción de lipopéptidos antimicrobianos y bacteriocinas (Biazini *et al.*, 2005; Cazorla *et al.*, 2007; Klein, 1993; Koumoutsi *et al.*, 2007;

Lisboa *et al.*, 2006; Ongena y Jacques, 2007; Oscáriz y Pisabarro, 2002; Von Tersch y Carlton, 1983) o, iv) de inducción de resistencia sistémica en la planta (Choudhary *et al.*, 2007; Choudhary y Johri, 2009). Por otra parte, la versatilidad metabólica de este grupo de bacterias como ACBs ha sido revelada mediante la secuenciación del genoma completo de algunos de los representantes más estudiados, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, en los cuales, resaltan la presencia de genes que contribuyen al establecimiento de una interacción altamente específica con las plantas y a un inesperado potencial para la producción de metabolitos secundarios, indicando que más del 8.5 y 5.0% respectivamente del genoma de estas dos importantes especies está involucrado en la síntesis de diversos compuestos esenciales en la colonización y antagonismo (Chen *et al.*, 2007; Stein, 2005).

Finalmente, la producción de endoesporas, característica intrínseca de este grupo de bacterias, se ha constituido en una de las principales fortalezas para su uso como ACBs en la actualidad, ya que desde el punto de vista tecnológico facilita la producción masiva de formulaciones comerciales más eficientes y estables, situación que constituye uno de los principales limitantes en la aplicación de otros ACBs. La capacidad de producir endoesporas por parte de las especies de *Bacillus* garantiza su prevalencia bajo diversas condiciones ambientales adversas como desecación, calor, radiaciones UV y acción de sustancias tóxicas. Estas consideraciones contribuyen significativamente a incrementar el interés para desarrollar productos antimicrobianos y/o promotores de crecimiento formulados comercialmente a base de *Bacillus* spp. o sus metabolitos como alternativa o métodos suplementarios a los productos químicos para el control de patógenos en diversas formas de aplicación (Ongena *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2002; Schisler *et al.*, 2004).

I.6. ECOLOGÍA MICROBIANA EN EL SISTEMA RADICAL DEL OLIVO

I.6.1. Los sistemas de cultivo del olivar y su efecto en la rizosfera del olivo

En el cultivo del olivo se han adoptado y desarrollado diversos sistemas de manejo y prácticas agrícolas a través del tiempo en las diferentes zonas geográficas productivas del Mediterráneo. En el caso particular de la olivicultura en España, esta diversidad de manejo está asociado a las condiciones agroecológicas del cultivo tales como: (i) la distribución anual de la pluviometría en dos períodos muy marcados, uno muy seco (junio-septiembre) y otro lluvioso (otoño-invierno) que originan diferencias en el contenido anual del agua en el suelo en función de la naturaleza del mismo (profundidad y capacidad de retención) y (ii) la erosión del suelo, considerado uno de los principales problemas de la olivicultura. Estos factores que condicionan el cultivo han generado la adopción de diversos sistemas de manejo y prácticas agrícolas en el olivar Español para superarlos. Entre estas prácticas agrícolas destacan el no laboreo y laboreo reducido, frente al laboreo convencional, el empleo de sistemas de manejo del suelo con cobertura mediante el uso de cubiertas (hojas y restos de poda, paja y materias diversas) y con cubierta vegetal viva (malas hierbas, plantas cultivada con crecimiento controlado mediante siega, herbicidas o ganado) entre muchas otras. Esta diversidad de prácticas, aunado a la intensa expansión y crecimiento de nuevas zonas de cultivo, ha promovido el desarrollo de investigaciones centradas fundamentalmente en comparar distintos sistemas de manejo del cultivo en la producción. Ejemplo de lo anterior es el desarrollo de una gran cantidad de trabajos de investigación en España que incluyen desde la multiplicación por enraizamiento de estaquillas semileñosas, cultivo de tejidos para la propagación en masa de diversos materiales genéticos, que han contribuido enormemente a la rápida expansión de la superficie cultivada con material vegetal de plantación de mejor calidad y más

homogéneo (Caballero y Del Rio, 2008), y aplicación de la fertilización por riego (fertirrigación) (Chouliarias *et al.*, 2009; Fernández-Escobar *et al.*, 2008a; 2008b; Morales-Sillero *et al.*, 2009) entre muchas otras.

En este contexto, el resultado de varias investigaciones han demostrado que los diferentes sistemas de cultivo y diversos factores de manejo en el olivo ejercen una influencia en mayor o menor grado en algunas propiedades químicas y físicas del suelo como son el contenido de materia orgánica, nitrógeno orgánico, fósforo y potasio asimilables, pH y capacidad de intercambio catiónico, así como en la porosidad, compactación y densidad aparente (Castro *et al.*, 2008; Pastor, 2008).

Sin embargo, en general son escasos los trabajos realizados relacionados con el estudio de la Ecología Microbiana en cultivos leñosos a nivel mundial, y en el caso del olivo, son muy pocas las investigaciones que se han realizado en relación al efecto de los diferentes sistemas de manejo del cultivo en la biodiversidad microbiana del suelo y la rizosfera. En la actualidad, en nuestro grupo de investigación se han iniciado investigaciones en este sentido enfocadas al estudio del efecto de los diferentes sistemas de manejo del suelo y del cultivo en la composición y diversidad genética, funcional y metabólica de las comunidades bacterianas del suelo y la rizosfera de olivo en Andalucía, la zona productora más importante del mundo de este cultivo.

Es conocido que en muchos cultivos, factores de manejo tales como laboreo, fertilización química, utilización de enmiendas orgánicas y aplicación de pesticidas entre otros, ejercen un efecto sobre la estructura y diversidad de las comunidades microbianas tanto del suelo como de la rizosfera (Kushwaha y Singh, 2005). Así en el caso particular del cultivo del olivo algunas investigaciones constatan que factores de manejo del cultivo como laboreo, tipo de fertilización, uso de cubiertas y control químico de malas hierba se han asociado con cambios en las características bioquímicas del suelo, y con cambios en la diversidad de nematofauna y diversidad de microorganismos y actividad metabólica de los suelos de olivar (Bastida *et al.*, 2008; Benitez *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2005;

Moreno *et al.*, 2009). En otros trabajos se ha demostrado que la utilización en el riego del agua residual de la molienda de olivo tiene un efecto significativo y consistente en las comunidades microbianas del suelo y rizosfera por alteraciones de las propiedades físico-químicas del suelo, condiciones oxidativas, competición por nitrógeno, disponibilidad de fenoles minerales y alteración de las fuentes de carbono (Karpouzas *et al.*, 2009; 2010). En esta misma línea de investigación, otros estudios han demostrado alteraciones a nivel de fotosíntesis en el olivo, presencia de carbohidratos solubles en la raíz y efectos directos en la colonización microbiana de la raíz (Mechri *et al.*, 2008), existiendo un incremento en el contenido de la relación C/N, P asimilable y K intercambiable en el suelo lo cual a su vez tiene un efecto directo en las comunidades bacterianas (Palese *et al.*, 2009).

Por otro lado, el efecto de diferentes sistemas de manejo y prácticas de cultivo en olivo cv. Maiatica, en el sureste de Italia, se ha demostrado que ejerce un efecto significativo en las poblaciones de bacterias totales cultivables, principalmente en las bacterias que están relacionadas con el proceso del ciclo del nitrógeno (Sofo *et al.*, 2010). Este trabajo resalta que los microorganismos del suelo responden a la aplicación de un manejo sostenible (caracterizado por fertilización química integrada con aporte de materia orgánica, riego por goteo, no laboreo mediante empleo de cubiertas vegetales e incorporación de material vegetal de poda). Así, este sistema mostró una mayor complejidad microbiana y mayor diversidad genética, metabólica y funcional de los microorganismos del suelo con evidentes beneficios para el rendimiento y calidad del olivo con respecto de las comunidades bacterianas encontradas asociadas a un manejo tradicional.

Otras investigaciones relacionadas con la Ecología Microbiana en olivo se han encaminado principalmente en el estudio de la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares como colonizadores nativos en la rizosfera de olivo (Calvente *et al.*, 2004; Caravaca *et al.*, 2002; Fabbri *et al.*, 2004) y la interacción de inoculantes bacterianos y la respuesta de

diferentes materiales varietales del olivo en los diferentes sistemas de multiplicación y producción de plantones en viveros (Binet *et al.*, 2007; Peyvandi *et al.*, 2010; Porrás- Piedra *et al.*, 2005).

I.6.2. La rizosfera del olivo como fuente de microorganismos con potencial biotecnológico

Muchas de las sustancias que actúan como agentes antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos son metabolitos secundarios que han sido obtenidos originalmente de microorganismos del suelo. Durante muchos años el estudio de comunidades microbianas en el suelo y la rizosfera de plantas estuvieron enfocados principalmente en la búsqueda de microorganismos promotores de crecimiento de plantas y antagonistas de patógenos. Sin embargo, la rizosfera de plantas silvestres y árboles de tejido leñoso es considerada en la actualidad un reservorio poco explorado con alto potencial para el descubrimiento de nuevas fuentes de microorganismos y producción de compuestos bioactivos que pudieran ser de gran utilidad en medicina, agricultura e industria como ciertas enzimas extracelulares, nuevas moléculas de uso médico con potencial en el tratamiento de enfermedades y nuevos antibióticos con diferente modo de acción, selectividad y actividad (Gasser *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Weisskopf *et al.*, 2008). Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral se plantea la posibilidad de que el olivo silvestre y cultivado, con su amplia diversidad genética, puede representar una importante fuente de microorganismos contenidos en su rizosfera que pueden poseer un alto potencial para producir compuestos nuevos de alto interés biotecnológico.

I.6.3. La Ecología Microbiana en el olivar Andaluz

Como se ha indicado con anterioridad, el olivar andaluz posee una enorme diversidad de formas de producción y técnicas de cultivo, desde olivares intensivos en zonas tradicionalmente no olivareras a olivares de sierra de baja productividad, con una amplia gama de situaciones intermedias en cuanto a producción y sistemas de manejo. El material vegetal del olivo cultivado en Andalucía se caracteriza por estar compuesto por un gran número de variedades y diversidad de densidades de plantación (de Graaff *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2008). Lo anterior resalta la importancia de estudiar el impacto que tienen estos factores en la biodiversidad microbiana del suelo y rizosfera en el olivar Andaluz. En este contexto, se ha documentado que el excesivo laboreo, o uso de pesticidas y fertilizantes contribuyen en gran medida a disminuir o incluso eliminar la biodiversidad del suelo debido a una degradación de la vegetación natural causando un impacto directo en los microorganismos y microfauna asociada al suelo rizosférico.

Aunque existe un gran número de estudios en diferentes áreas geográficas de ambiente Mediterráneo en los que se relaciona la influencia del manejo del suelo, incluyendo el empleo de cubiertas vegetales, con la erosión del suelo y/o la disponibilidad y pérdida de agua y nutrientes entre otros (e.g., Francia *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 1999; Milgroom *et al.*, 2006; 2007; Villalobos *et al.*, 2006) hasta hace relativamente poco tiempo no se ha determinado el efecto de estas prácticas de manejo del cultivo en las características biológicas de los suelos de olivar en Andalucía, y cuando se han llevado estudios de este tipo, han sido en un número muy reducido de olivares o dentro de una misma finca experimental subdividida en zonas con diferentes sistemas de manejo (e.g., Benítez *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008; García-Ruiz *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009).

En esta misma línea, investigaciones llevadas a cabo en el grupo AGR-136 Sanidad vegetal del Dpto. Protección de Cultivos del IAS-CSIC en colaboración con investigadores del Dpto. de Agronomía del mismo

centro, han determinado un efecto significativo del ambiente (determinado por la zona geográfica), tipo de suelo, y sistema de manejo del suelo (laboreo convencional, mínimo laboreo, cubierta vegetal controlada por desbroce o pastoreo) sobre diversas propiedades biológicas del suelo de olivar incluyendo respiración del suelo, biomasa microbiana, y niveles de población de bacterias cultivables totales (Álvarez *et al.*, 2007). Por lo antes mencionado, se considera de suma importancia llevar a cabo estudios sobre la biodiversidad microbiana en suelo y rizosfera del olivar Andaluz, ya que podría representar un excelente indicador biológico del efecto de diversos factores de manejo en este cultivo. Ésto podría resultar esencial en la incorporación de nuevas tecnologías y estrategias para una moderna producción de olivo y sobre todo la selección del sistema productivo más adecuado desde un punto de vista sostenible.

En la actualidad, se ha demostrado que la diversidad microbiana del suelo y rizosfera permite establecer claramente diferencias entre sistemas de manejo y evaluar el desarrollo, perturbación y madurez de un agroecosistema. Por consiguiente, por todo lo anteriormente expuesto se demuestra la importancia de la investigación planteada en esta Tesis Doctoral centrada en el estudio de las comunidades microbianas en suelo y rizosfera del olivar Andaluz, ya que el desarrollo de conocimiento enfocado al análisis estructural y funcional de comunidades bacterianas permitirá en el futuro la selección de sistemas óptimos de manejo, desarrollar o adoptar nuevas técnicas capaces de mejorar el sistema productivo del olivo, además de preservar la calidad, salud y fertilidad del suelo (Anderson, 2003; Govaerts *et al.*, 2008; Hochstrat *et al.*, 2006; Kushwaha y Singh, 2005; Lal, 2004).

CAPÍTULO II

II

OBJETIVOS

II.1. NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN PLANTEADA

El olivo cultivado tiene un origen ancestral, e históricamente representa el principal cultivo oleaginoso de la región del Mediterráneo. El olivar se caracteriza por albergar una amplia diversidad genética, desde la contenida en el germoplasma del predecesor evolutivo del olivo, el acebuche, hasta la disponible en las formas cultivadas de éste en la actualidad, por lo que ambos constituyen una importante fuente de diversidad genética. Diversas investigaciones en el área de la Ecología Microbiana han demostrado que existe una interacción altamente específica entre las comunidades bacterianas con la rizosfera de las plantas, de tal forma que la estructura y dinámica de estas comunidades es influenciada por diversos factores, incluyendo la especie y genotipo de la planta cultivada, su estado fenológico, el tipo de suelo y las prácticas de manejo empleados en sus sistemas de producción.

En Andalucía, se ha encontrado que las poblaciones de olivo silvestre conforman un cluster genético separado e independiente del resto de los olivares cultivados de la misma área y de otras zonas cultivadas de olivo en España, así como del resto de las poblaciones de olivo silvestre, lo cual lo hace un recurso genético único. En los olivares cultivados de Andalucía, existen diversos sistemas de producción, desde los tradicionales y marginales, hasta los altamente tecnificados, y desde los de producción orgánica o ecológica hasta los que utilizan altos niveles de fertilizantes de síntesis y fitosanitarios, así como los que emplean diversos sistemas de manejo del suelo frente al clásico laboreo. Esta diversidad de manejo de los olivares incrementa el interés de conocer la composición de las comunidades microbianas que albergan y el efecto de cada sistema de manejo sobre ellas.

En la actualidad, existe un escaso conocimiento sobre la frecuencia, diversidad y actividad de bacterias rizosféricas o endofitas en la raíz tanto en olivo cultivado como en el silvestre. Por ello, es de especial interés conocer y comparar la composición de las comunidades bacterianas

asociadas a la rizosfera de acebuches silvestres, así como de olivo cultivado bajo los diferentes escenarios de sistemas productivos de cultivo. Dicho conocimiento nos permitiría identificar y valorar las posibles interacciones entre los distintos genotipos de *Olea europaea* subsp. *europaea* (genotipos silvestres, cultivares, ecotipos, etc.), el tipo y manejo del suelo y del cultivo con las poblaciones bacterianas específicas contenidas en su rizosfera. Esto ofrecería la posibilidad de encontrar rizobacterias asociadas específicamente a genotipos y/o sistemas de manejo de olivo, que pueden constituir una importante fuente de microorganismos cultivables con potencialidad para aplicaciones biotecnológicas como promotores del crecimiento vegetal y agentes de biocontrol, así como ser una fuente para la síntesis de nuevas moléculas y compuestos de interés biotecnológico, farmacéutico o industrial.

En el olivo cultivado, la Verticilosis del olivo es una enfermedad que se presenta con altos niveles de incidencia y severidad en diversas zonas productoras de olivar en España. Las dificultades en su manejo y control, incrementan la necesidad de buscar alternativas eficientes y sostenibles en su manejo en este cultivo. En este contexto, el estudio de las comunidades bacterianas asociadas al olivo silvestre o acebuche, como fuente de variabilidad genética microbiana escasamente explorada, representa una oportunidad en la búsqueda de nuevos microorganismos de interés agronómico que pudieran no encontrarse en las variedades cultivadas y que permita incorporar nuevos elementos en el desarrollo de estrategias para un mejor manejo de esta enfermedad y consecuentemente repercutir positivamente sobre aspectos económicos y ambientales en el sistema productivo actual del cultivo de olivo.

Actualmente existen escasas investigaciones tanto a nivel regional como mundial que hayan abordado el estudio de las comunidades bacterianas en el sistema radical de olivo incluyendo tanto su forma silvestre como la cultivada y en suelos de olivares. Por lo tanto, la presente Tesis Doctoral se centrará en el estudio de la estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera del olivo cultivado y

silvestre en diferentes condiciones de interacción genotipo-ambiente y manejo agrícola mediante la utilización de técnicas validadas internacionalmente dependientes o no del cultivo de microorganismos que permitirán determinar la estructura y diversidad de comunidades bacterianas totales en los diferentes sistemas de producción del olivo en la principal zona cultivadora a nivel mundial, Andalucía, así como caracterizar bacterias de la rizosfera con diferente potencial biotecnológico.

II.2. OBJETIVOS

El Objetivo general de esta Tesis Doctoral es generar conocimiento sobre la estructura y diversidad genética de las comunidades bacterianas de la rizosfera y suelo no rizosférico asociados al olivo en Andalucía, desde el punto de vista de biodiversidad genética de la planta, sistemas de manejo del cultivo y características del suelo como factores determinantes en la composición de la misma.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar la estructura y diversidad genética de las comunidades bacterianas totales en la rizosfera de acebuches silvestres (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) en ecosistemas naturales y en suelos de olivares centenarios (*O. europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) en zonas representativas para el cultivo del olivo en Andalucía, mediante diversos métodos biotecnológicos de análisis de poblaciones microbianas.

2. Determinar el efecto del material vegetal de origen y el genotipo de plantones certificados de variedades olivo (*O. europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) en la estructura inicial y densidades de población de las comunidades bacterianas en el sistema radical y los cambios producidos en aquéllas después de 1,5 años de interacción con un suelo de cultivo seleccionado *ad hoc*.

3. Constituir, identificar y caracterizar una colección de aislados de rizobacterias de olivo silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) que presenten alta actividad antagonista contra el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* Kleb. y determinar su potencial antagonista mediante selección asistida utilizando marcadores fenotípicos y moleculares.

4. Aislar, identificar y caracterizar fenotípicamente y molecularmente aislados bacterianos a partir de la rizosfera de olivo silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y olivo cultivado (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) con interés para diversas aplicaciones biotecnológicas. .

CAPÍTULO III

III

El tipo de suelo y su sistema de manejo determinan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en fincas de olivar con manejo orgánico en Andalucía

En este capítulo se recogen los resultados relativos al objetivo primero de esta Tesis Doctoral, en el cual se pretendía:

Determinar la estructura y diversidad genética de las comunidades bacterianas totales en suelos de olivares centenarios (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) en dos zonas de las más representativas para el cultivo del olivo en Andalucía.

III.1. RESUMEN

Durante miles de años, el olivo cultivado ha sido el principal cultivo oleaginoso de la Cuenca Mediterránea. España es el principal país productor del mundo y en Andalucía, la región sur del país, se concentra el 62 % del cultivo en España. Esta zona, donde el cultivo de olivar tiene una enorme importancia tanto en aspectos socioeconómicos como ecológicos, se caracteriza por presentar diferentes sistemas de manejo del cultivo. Las comunidades microbianas del suelo desempeñan un papel integral y fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas influyendo en importantes procesos y funciones del suelo y de las plantas. Aunque es conocido que las prácticas de manejo agrícola afectan a la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en el suelo y la rizosfera, pocos estudios han evaluado el efecto de las prácticas de manejo del cultivo sobre las características biológicas en olivar, y no existen investigaciones exhaustivas que documenten el efecto específico de las prácticas de manejo del suelo en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas del suelo en cultivos comerciales de olivo en España.

En esta investigación, se utilizó el análisis del polimorfismo de los fragmentos fluorescentes de restricción terminal (FT-RFLP) para estudiar las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas en muestras de suelo de 46 plantaciones comerciales de olivo orgánico y 12 áreas naturales cercanas con diferentes tipos de suelo y manejo de éste en dos de las zonas más representativas para el cultivo de olivo en la región de Andalucía, *Sierra Morena* y *Campiña*. Los datos se analizaron utilizando un enfoque estadístico para identificar asociaciones específicas entre las poblaciones microbianas y tipo de suelo o sistemas de manejo. Los resultados indican que los valores de los índices Riqueza y Shannon-Weiner de diversidad variaron dependiendo de la enzima de restricción utilizada (*Rsal* y *Mspl*), el tipo de suelo y el sistema de manejo de éste. El análisis canónico discriminante de los TRFs permitió clasificar la totalidad

de las muestras de suelo (100%) en función del tipo de suelo ya sea utilizando *Mspl* de forma individual o combinado con *Rsal*. De igual forma, para *Rsal*, el 100% de los suelos muestreados en *Campiña* y el 90,63% de los suelos en *Sierra Morena* fueron asignados de forma correcta a su tipo de suelo. Resultados similares se obtuvieron para los tipos de manejo del suelo. Así, la función discriminante obtenida permitió clasificar la totalidad de las muestras de suelo (100%) de acuerdo a su sistema de manejo para *Mspl* solo o combinado con *Rsal*, demostrando que el tipo de suelo y su sistema de manejo condiciona significativamente la diversidad y estructura de las poblaciones bacterianas en el suelo de estos olivares. Finalmente se han asociando grupos taxonómicos operacionales concretos (OTUs), ejemplificados por los TRFs, con cada uno de los sistemas de manejo que podrán ser utilizados como indicadores de calidad o del sistema de manejo.

III.2. INTRODUCCIÓN

El origen del olivo cultivado (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) probablemente surge en los albores de la agricultura y se cree que se originó en Oriente Medio, dispersándolo los Fenicios y Griegos hacia el sur y oeste del resto de la Cuenca Mediterránea (Runnels y Hanse, 1986). Por miles de años, el olivo cultivado ha sido el principal cultivo oleaginoso de esta región. Actualmente, el aceite de oliva extra-virgen se ha convertido en un producto alimenticio muy importante en relación con otros aceites vegetales, gracias a sus ventajas nutricionales y saludables para la dieta humana previniendo enfermedades tales como la hipertensión, enfermedades del corazón, la arteriosclerosis y la diabetes.

Históricamente y hasta la actualidad, los olivares han constituido un paisaje cultural valioso determinando la rentabilidad, la vida y condiciones de trabajo y la calidad del medio ambiente en muchas regiones de la Cuenca Mediterránea y siguen siendo parte integral de la economía de

muchos países en esta región. España tiene más de 2,5 millones de hectáreas de los 9,5 millones de hectáreas cultivadas de olivo en el mundo, concentrándose el 62 % (>1,5 millones) de éstas en Andalucía, la región sur del país. En esta región el olivo representa más del 39% de la producción mundial de aceite de oliva, la generación de 2.000 millones de \$ y el 17% de la superficie total de la región, en un monocultivo impresionante (Beaufoy, 2001; Belaj *et al.*, 2003; International Olive Oil Council, 2006, Consejería de Agricultura y Pesca, 2007). En Andalucía donde el olivo tiene una enorme importancia tanto en aspectos socioeconómicos como ecológicos, se pueden diferenciar tres sistemas de cultivo incluyendo: (i) sistemas agroforestales donde muchos olivares se limitan a laderas o terreno accidentado, que ocupan gran parte de las montañas y colinas del paisaje típico mediterráneo; (ii) olivares tradicionales localizados en llanuras onduladas, con pendientes suaves, suelos más profundos y mejores, normalmente de secano, con baja densidad de plantación (menos de 100 olivos/ha), laboreo intensivo, bajos insumos en fertilizantes y plaguicidas y cosecha manual; y (iii) nuevas fincas de cultivo intensivo donde los olivares tradicionales están siendo adaptados o progresivamente sustituidos por altas densidades de plantación (200-400 olivos/ha), riego por goteo, laboreo reducido, una elevada utilización de fertilizantes y plaguicidas y cosecha mecánica con el fin de aumentar el rendimiento y la productividad (CAP-JA, 2009; FAO, 2006; Milgroom *et al.*, 2007).

Al mismo tiempo que se está llevando a cabo la intensificación de los olivares, la producción en el olivar se ha convertido también en escenario de la tendencia mundial de utilización de estrategias agrícolas respetuosas del medio ambiente. Así, nuevos sistemas de manejo tales como la producción integrada y agricultura orgánica están siendo fomentados para reducir el impacto negativo en el medio ambiente del uso excesivo de pesticidas y fertilizantes. Además, existe un importante incremento en la demanda de aceite extra virgen orgánico certificado que añade un beneficio monetario a los ingresos de los agricultores. En este

sentido, los gobiernos han desarrollado una legislación para regular y reforzar el cultivo del olivo bajo prácticas orgánicas. Así, el cultivo del olivo en el marco de las directrices del manejo orgánico en Andalucía se ha incrementado en los últimos 10 años, con más de 42.000 ha y la mayoría de ellas (más del 40%) localizadas en la provincia de Córdoba (CAP-JA, 2009).

Tradicionalmente, la mayoría de las fincas de olivar han utilizado laboreo convencional con el fin de reducir la competencia de las malas hierbas por la absorción de agua y nutrientes. La plantación tradicional de olivos a baja densidad (olivos ampliamente espaciados), de la mayoría de los olivares, combinado con una débil cubierta vegetal del suelo, incrementa la vulnerabilidad de esos olivares a la erosión del suelo. En el sur de España, recientemente se han introducido métodos alternativos de manejo del suelo para reducir al mínimo la erosión del suelo, incluyendo el no-laboreo, laboreo reducido con o sin control de malas hierbas, utilización de cubiertas vegetales (naturales o de siembra) en el otoño y eliminación de las mismas con herbicidas en la primavera y/o cortado posterior mediante desbroce o control mediante pastoreo (CAP-JA, 2009; Milgroom *et al.*, 2007).

A pesar de que existen varios estudios sobre la influencia del manejo del suelo, incluyendo el uso de cubiertas, sobre las propiedades físico-químicas, niveles de erosión, disponibilidad de agua y las pérdidas de nutrientes en los suelos de olivar en diferentes zonas del Mediterráneo (e.g., Francia *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 1999; Milgroom *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2006), hasta recientemente, pocos estudios habían evaluado el efecto de las prácticas de manejo del cultivo sobre las características biológicas de los suelos de olivar en España (Álvarez *et al.*, 2007). Además, cuando se analizaron algunos indicadores biológicos en esos estudios, o se incluyeron pocos olivares o las prácticas de manejo se utilizaron en una única finca experimental (e.g., García-Ruiz *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2006; Sofo *et al.*, 2010).

Los suelos representan probablemente los sistemas más complejos, diversos e importantes en la biosfera. La magnitud de la diversidad microbiana en los suelos agrícolas es fundamental para mantener la salud y calidad del mismo (Zhou *et al.*, 2003). Las comunidades microbianas del suelo desempeñan un papel integral y a menudo único en las funciones de los ecosistemas impactando en muchos e importantes procesos y funciones del suelo y de las plantas tales como: la regulación de la descomposición de la materia orgánica; el ciclo biogeoquímico del carbono, nitrógeno y otros nutrientes; mantenimiento de la productividad del suelo y la calidad del agua; la descomposición de contaminantes, etc.; los cuales al mismo tiempo afectan directa e indirectamente a la salud y productividad de los cultivos (Bri e  *et al.*, 2007; Carson *et al.*, 2007; H ery *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2003; Larkin, 2003).

Dado que las técnicas de cultivo-dependiente permiten el acceso solamente a una pequeña fracción de las comunidades microbianas del suelo, en los últimos años varias herramientas moleculares han sido propuestas para estudiar la estructura de las comunidades microbianas en el suelo. El análisis del polimorfismo de los fragmentos fluorescentes de restricción terminal (FT-RFLP) (Liu *et al.*, 1997), técnica basada en PCR, ha demostrado ser una metodología de cultivo-independiente consistente, de alta resolución y rendimiento, que ha sido comúnmente utilizada para reflejar las diferencias en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en diferentes sistemas normalmente en base a secuencias de ADN ribosomal, así como para detectar de forma fiable los cambios en los componentes de la estructura de las comunidades microbianas como respuesta a cambios en el medio ambiente del suelo (Burke *et al.*, 2005; Casamayor *et al.*, 2002; Graff y Conrad, 2005; Hartmann *et al.*, 2006; Hartmann y Widmer, 2008; Kaplan *et al.*, 2004; Lazzaro *et al.*, 2007; Lukow *et al.*, 2000; McSpadden-Gardener y Weller, 2001; Osborn *et al.*, 2000; Pesaro *et al.*, 2004; Tiedje *et al.*, 1999; Widmer *et al.*, 2006).

Las prácticas de manejo agrícolas influyen en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en el suelo y la rizosfera. Los

resultados de diversas investigaciones han demostrado que el tipo de suelo, las especies de plantas cultivadas, estrategias de manejo del suelo y su interacción, afectan a las comunidades microbianas del suelo (Berg *et al.*, 2002; Garveba *et al.*, 2004; Girvan *et al.*, 2003; Hiddink *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2003). Por lo tanto, es esencial analizar el impacto de diferentes prácticas de manejo del suelo en las estructuras de las comunidades microbianas en los suelos agrícolas, lo cual puede permitir una mejor comprensión del efecto neto de estas prácticas sobre la salud y calidad de los mismos, así como ayudar en la elección del sistema de manejo más apropiado en un ecosistema agrícola.

Hasta la fecha, no existen estudios que evidencien el efecto específico de las prácticas de manejo agrícolas en la composición de las comunidades microbianas del suelo en cultivos comerciales de olivo en España. En este trabajo, se utilizó el análisis de FT-RFLP para estudiar las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas en muestras de suelo de 46 plantaciones comerciales de olivo orgánico y 12 suelos de zonas con vegetación natural cercanas a los olivares muestreados y con diferentes tipos de suelo. Las fincas de olivar han estado sometidas a los diferentes sistemas de manejo de suelo durante largo tiempo (>10 años), en dos de las zonas más representativas para el cultivo de olivo en la región de Andalucía, y que representan ejemplos de sistemas agroforestales y plantaciones tradicionales. Nuestra hipótesis es que dentro de cada suelo de las fincas de olivar los diferentes tipos de suelo y sistemas de manejo contribuyen a modificar la diversidad, riqueza y estructura de las comunidades bacterianas. Por consiguiente, ya que las comunidades microbianas del suelo son conocidas por ser muy complejas, la información obtenida a partir de los análisis genéticos moleculares ha sido recopilada y analizada usando un enfoque estadístico multivariante que ayudará a identificar asociaciones específicas entre las poblaciones microbianas y tipos de suelo o los diferentes sistemas de manejo.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1. Zonas de estudio y muestreo de campo

Las dos zonas estudiadas (*Sierra Morena* y *Campiña*) se localizan en las zonas más representativas para el cultivo del olivo en la provincia de Córdoba, Andalucía (Fig. III.1). La primera, *Sierra Morena*, es un ejemplo de zona montañosa con cultivo tradicional de olivo, que se remonta a mediados del siglo XIX. En esta zona, la producción de olivo ha sido tradicionalmente llevada a cabo con sistemas de manejo de baja intensidad basados en el laboreo ligero, pastoreo de ganado o una combinación de ambos (Álvarez *et al.*, 2007). Este área de estudio se localiza en la zona norte de la provincia de Córdoba (38.37°-38.13° N, 4.88°- 4.72° O) (Fig. III.1) tiene clima Mediterráneo, con un promedio de precipitación anual de alrededor de 500-700 mm, concentrada principalmente entre Noviembre y Abril, un promedio de evapotranspiración de referencia anual de 850 mm, una temperatura media anual de 16 ° C y una altitud entre 500 a 958 m. En esta zona se identificaron y muestrearon dos tipos de suelo principales (Álvarez *et al.*, 2007): Un Regosol Eútrico (RGeu) y Cambisol Eútrico (CMeu) de acuerdo con la clasificación de la FAO (2006), y dentro de cada tipo de suelo, se seleccionaron 13 fincas de olivar con dos tipos de sistemas de manejo del suelo: *i*) laboreo ligero (LT), realizado una vez al año, usualmente en primavera (5 fincas), y *ii*) manejo de la cubierta con pastoreo de ovejas todo el año (G), (8 fincas) (Fig. III.1).

La segunda área de estudio, *Campiña*, se caracteriza por llanuras onduladas, con pendientes suaves, suelos más profundos y mejores, y un manejo más intensivo, implicando fincas más productivas (Milgroom *et al.*, 2007). Se encuentra localizada al sur de la provincia de Córdoba (entre 37.75°-37.20° N, 4.67°-4.17° O) (Fig. III.1). El clima de la zona es típicamente Mediterráneo, con un promedio de precipitación anual alrededor de 500-700 mm, concentrada principalmente entre Noviembre y Abril, un promedio de evapotranspiración de referencia anual de 1.250 mm,

una temperatura media anual de 16 °C y la altitud del área de estudio se encuentra entre 230 a 593 m. En esta zona se identificaron y muestrearon dos tipos de suelo principales (Soriano *et al.*, 2010): Un Regosol Calcárico (RGca) y Cambisol Cálculo (CMcc), de acuerdo con la clasificación de la FAO (2006), y dentro de cada tipo de suelo, se seleccionaron 10 fincas de olivar de secano con dos tipos de sistemas de manejo del suelo: *i*) laboreo convencional (T), consistiendo de un pase cruzado con “chisel” o cultivador (aproximadamente 15-20 cm de profundidad) a principios de primavera y dos o tres pasadas con plancha-niveladora a partir de finales de primavera y principios de otoño (5 fincas), y *ii*) cobertura del suelo controlada por desbroce (M) realizada dos o tres veces entre Marzo y Junio, dependiendo del crecimiento de malas hierbas (5 fincas).

En ambas áreas, las 46 fincas fueron seleccionadas con el criterio de que al menos: *i*) el mismo sistema de manejo del suelo se había utilizado durante los cinco años anteriores, o *ii*) las fincas habían estado en producción durante cuatro décadas. Además tres áreas no alteradas con vegetación natural (NV), incluyendo arbustos perennes, de las familias Cistaceae, Lamiaceae aromáticas, Ericaceae, Myrtaceae y algunos árboles perennes en su mayoría especies de *Quercus* fueron seleccionadas en cada tipo de suelo y localidad (NV-C para *Campiña* y NV-SM para *Sierra Morena*) cerca de las fincas para servir como puntos de referencia de suelos no alterados (12 sitios en total) (Fig. III.1).

La toma de muestras del suelo se realizó en el mismo momento para todas las fincas desde finales de Mayo hasta principios de Junio de 2006. En cada olivar, un área de muestreo (400 m²) considerada representativa de ésta se seleccionó en el centro de la finca. Las muestras de suelo de cada área de muestreo fueron recogidas a una profundidad de 0-20 cm en cinco puntos al azar fuera de la cobertura de la copa de los árboles de olivo. Todas las muestras de suelo del mismo olivar se homogenizaron antes del análisis. La mayoría de las propiedades físico-químicas del suelo más comunes y la población de bacterias heterotróficas

cultivables han sido determinadas en estudios previos (Álvarez *et al.*, 2007; Soriano *et al.*, 2010).

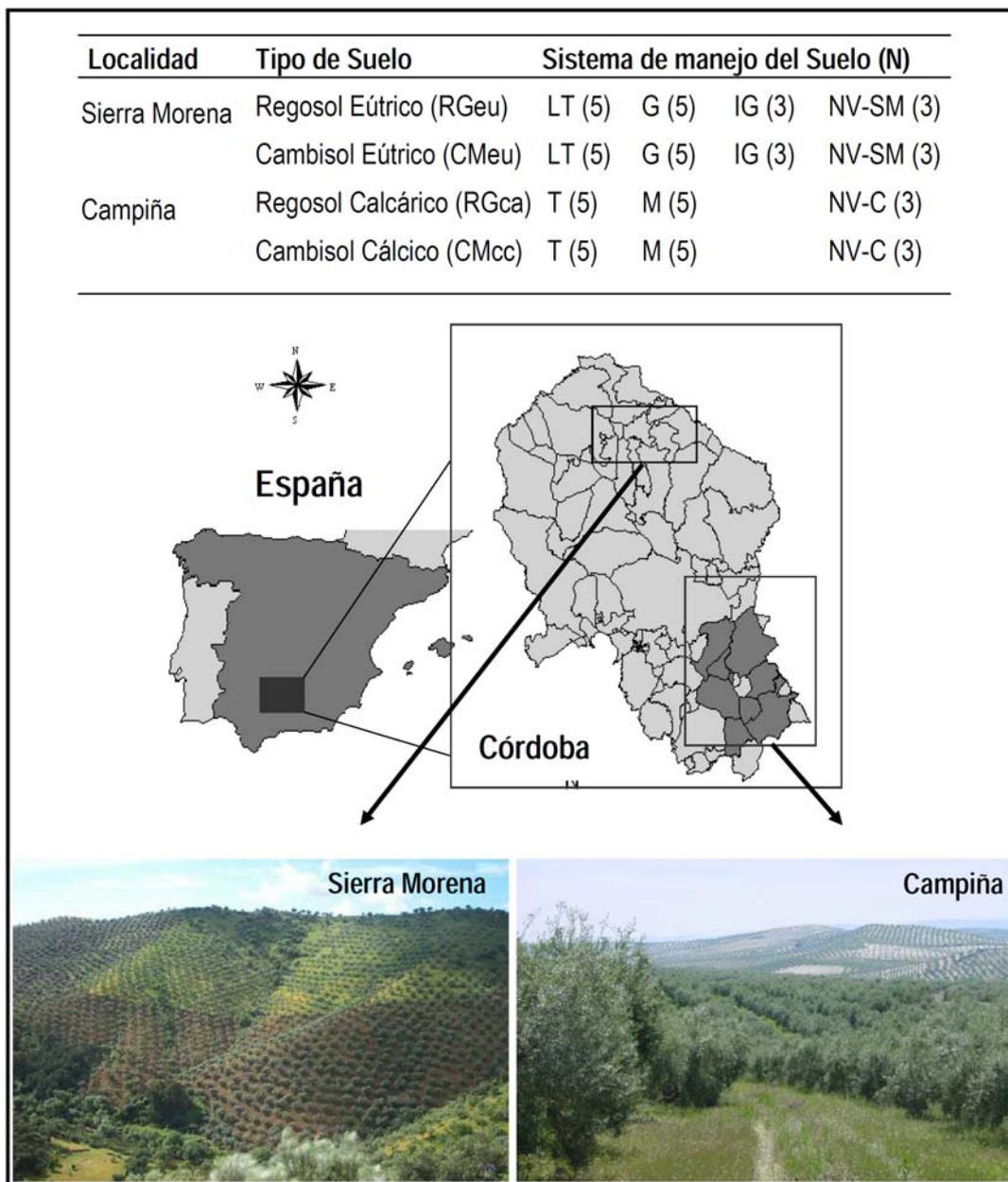


Fig. III.1. Localización de las zonas de estudio y muestreo, *Sierra Morena* y *Campiña*, en la provincia de Córdoba, Andalucía. LT (laboreo ligero), G (pastoreo); T (laboreo); M (desbroce); NV-SM (vegetación natural, *Sierra Morena*); NV-C (vegetación natural, *Campiña*).

III.3.2. Extracción y cuantificación del ADN del suelo

El ADN total del suelo se extrajo a partir de 250 mg de suelo de cada muestra (tres repeticiones por muestra) mediante el MoBio Ultraclean™ Soil DNA isolation kit (MoBio laboratories, Inc; Carlsbad, CA, EE.UU.). El ADN fue extraído de acuerdo a las instrucciones del fabricante con las siguientes excepciones: i) las muestras de suelo se agitaron para disgregar las partículas del suelo y las células bacterianas con el sistema FastPrep-24 a 5.0 m/s por 40 s (MP Biomedicals, Inc., Francia); y ii) se utilizó agua para la elución del ADN en el paso final en lugar de la solución proporcionada por el fabricante. Se evaluó la integridad y calidad del ADN extraído y se cuantificó mediante tinción con bromuro de etidio utilizando el Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric assay (Molecular Probes Inc., Leiden, Holanda) (Landa *et al.*, 2006) y con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). Las concentración de ADN obtenida de las muestras de suelo variaron en un rango de 5 a 30 ng/μl y fue utilizado directamente para su amplificación.

III.3.3. Perfiles de las comunidades bacterianas

La estructura de las comunidades bacterianas en el suelo de los olivares muestreados fue estudiada mediante un enfoque molecular utilizando el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminales Fluorescentes (FT-RFLP, siglas en inglés) de las secuencias amplificadas de la región 16S del ADNr. Los genes 16S ADNr se amplificaron utilizando los iniciadores 8f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -3') (Weisburg *et al.*, 1991). El iniciador 8f fue marcado con FAM (6-carboxyfluoresceína) para la visualización de los fragmentos de restricción terminal (TRF). La reacción PCR se realizó en un volumen final de 25 μl utilizando 2.5 μl 10x

buffer libre de Mg, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 15 µl de agua ultra-pura estéril (Sigma, Molecular Biology Reagent), 1 mM de cada iniciador, 0.5 µg RNasa, 0.33 µl de BiotaqTM polimerasa (BioLine, Londres, Reino Unido) y 2.5 µl del ADN diana de las muestras de rizosfera. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 Bio-Rad (Bio-Rad, Madrid, España) y el programa para la amplificación constó de un paso de 5 min de desnaturalización inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 45 s y 70 °C por 1 min, y una extensión final a 70 °C por 8 min. El éxito en la amplificación de la PCR fue inicialmente verificada mediante electroforesis en gel de agarosa antes de realizar el análisis FT-RFLP.

Para la digestión de los productos de PCR amplificados, se utilizaron los enzimas de restricción *MspI* y *RsaI* (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). La digestión se realizó en 10 µl de reacción conteniendo 5 unidades de las enzimas *MspI* o *RsaI*, y 4 µl del producto de PCR marcado. Las digestiones fueron realizadas a 37 °C durante 3 h seguidas de un paso de inactivación de 65 °C durante 10 min. Cuatro microlitros del ADN digerido se diluyeron en 6 µl de agua para el análisis de fragmentos. Los TRFs fueron separados en un analizador genético 3130XL (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados utilizando el estándar de tamaño ROX500, y las matrices que contenían la incidencia, así como la altura y área de los picos de los datos individuales de TRF de todas las muestras se generaron con el paquete estadístico Genemapper version 3.7 (Applied Biosystems). Los picos menores de 100 unidades de fluorescencia y 50 pb no fueron incluidos en el análisis para eliminar los dímeros de iniciadores y otras pequeñas moléculas presentes en los perfiles, así como aquellos TRFs que no se encontraban presentes en al menos dos de las tres repeticiones de los perfiles. También los TRFs que difirieron en menos de 1 pb fueron agrupados, a menos que los picos individuales fueran detectados de una forma reproducible. Finalmente los perfiles de FT-RFLP fueron

estandarizados basándose en el método descrito previamente por Dunbar *et al.*, (2001). La abundancia relativa de cada TRF fue calculada como el ratio del área del pico para ese TRF respecto de la suma del área de todos los TRFs en el perfil, expresado en porcentaje.

III.3.4. Estadísticos de diversidad y análisis de datos

Los estadísticos de diversidad fueron calculados a partir de perfiles normalizados de las muestras de la rizosfera mediante el número y área de los picos (TRFs) en cada perfil como representaciones del número y abundancia relativa de filotipos o unidades taxonómicas operacionales (OTUs), según lo definido por Dunbar *et al.*, (2000). La riqueza de filotipos (S) fue calculada como el número total de TRFs con distinto tamaño (entre 50 y 500 pb) en el perfil. El índice de diversidad de Shannon-Weiner (Shannon y Weaver, 1963) fue calculado de la siguiente manera: $H = - \sum (p_i) (\log p_i)$, donde p es la proporción del área de un pico individual en relación con la suma de todas las áreas de los picos en una muestra (Hackl *et al.*, 2004).

Se llevó a cabo un análisis canónico discriminante (ACD) para determinar el grado de asociación entre los valores de TRFs obtenidos con los enzimas de restricción *MspI* y *RsaI* de forma independiente o combinados (*MspI*+*RsaI*) en relación a los distintos grupos de suelos de olivar establecidos, esto es, (i) los cuatro tipos de suelo (RGeu, CMeu, RGca, y CMcc) y (ii) los seis sistemas de manejo (LT, G, NV-SM, T, M, NV-C) en análisis independientes. En primer lugar, se realizó un análisis por pasos ('stepwise') mediante el módulo STEPDISC del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.) con objeto de eliminar aquellos TRFs del modelo discriminante que no aportasen información adicional o fuesen redundantes con los ya seleccionados de acuerdo al valor del estadístico Wilk's lambda, así como añadir aquellos TRFs no incluidos previamente que mayor contribución

tuviesen en el modelo con objeto de obtener la función con el máximo poder discriminante (Khattree y Naik, 2000). Los TRFs seleccionados fueron utilizados para generar una función discriminante utilizando el módulo DISCRIM de SAS que se utilizó para determinar el nivel de precisión en la clasificación del conjunto de grupos de suelos de olivar en el estudio en base a la matriz total de covarianza y probabilidades a priori.

En una segunda fase, los TRFs seleccionados en el análisis discriminante se incluyeron en un análisis canónico utilizando el módulo CANDISC de SAS. Este análisis permite separar los grupos en el estudio (tipos de suelo y sistemas de manejo) en base a una combinación lineal de los TRFs seleccionados denominadas funciones o variables canónicas que maximizan la variación entre los grupos y minimizan la variación dentro de ellos. La distancia de Mahalanobis, definida como el cuadrado de la distancia entre las medidas de los valores estandarizados del valor central de cada grupo, fue utilizada para determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos (Khattree y Naik, 2000). Finalmente, los diferentes grupos analizados se representaron en relación a sus coordenadas frente a las tres primeras funciones canónicas en gráficos XY.

III.4. RESULTADOS

Las amplificaciones realizadas a partir del ADN extraído directamente de las muestras de suelo generó amplicones de aproximadamente 1.500 pb. Tanto la posición del fragmento (tamaño) como el área de éste se consideraron parámetros para la comparación de los perfiles bacterianos después de ser estandarizados según la metodología descrita por Hackl *et al.* (2004). Los dos enzimas de restricción utilizados para generar los perfiles genéticos en el análisis de FT-RFLP, *MspI* y *RsaI*, generaron de forma consistente entre 27 a 113 y 10 a 55 picos o TRFs discernibles, respectivamente, dependiendo de la muestra de suelo y la repetición (Tabla III.1). Sin embargo, *MspI* generó un mayor número de TRFs diferentes (150) en comparación con *RsaI* (109)

(Tabla III.1). Los valores de los índices Riqueza y Shannon-Weiner de diversidad variaron dependiendo del enzima de restricción utilizado, el tipo de suelo y el sistema de manejo de éste (Tabla III.1).

Cuando se analizaron estos estadísticos de diversidad obtenidos para *Mspl* se encontró que los dos suelos en *Sierra Morena* (RGeu y CMeu) tenían valores significativamente ($P=0.0273$) mayores del índice Shannon-Weiner en comparación de los obtenidos para el suelo RGca de Campiña. Similarmente, existieron diferencias significativas ($P=0.0020$) en ambos índices de diversidad en función del sistema de manejo del suelo con el laboreo ligero (LT) y manejo de cubierta con ganado (G) en *Sierra Morena* y manejo de cubierta con desbroce en *Campiña* presentando los mayores valores de los índices Riqueza y Shannon-Weiner. Por otro lado, los suelos en zonas naturales de *Campiña* (NV-C) mostraron los menores valores de diversidad de estos índices (Tabla III.1). No se encontraron diferencias significativas para ambos índices de diversidad cuando se estimaron a partir de los TRFs obtenidos con el enzima *Rsal* (datos no mostrados).

Tabla III.1. Índices de diversidad (rango) asociados a las comunidades bacterianas totales de 46 suelos de olivar y 12 áreas naturales localizados en diferentes tipos de suelo^a bajo diferentes sistemas de manejo del suelo (SMS)^b en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (*Campiña* y *Sierra Morena*) en Andalucía, sur de España

Enzima de Restricción	Localidad	SMS	Riqueza (Número de TRFs)				Índice de Shannon			
			RGeu	CMeu	RGca	CMcc	RGeu	CMeu	RGca	CMcc
<i>Mspl</i>	<i>Sierra</i>	G	43-113	55-91			1.48-1.78	1.51-1.69		
		LT	57-103	47-85			1.53-1.75	1.47-1.68		
		NV-SM	41-62	82-92			1.43-1.64	1.58-1.64		
	<i>Campiña</i>	M			67-85	69-71			1.51-1.61	1.54-1.66
		T			57-77	58-83			1.33-1.61	1.48-1.70
		NV-C			27-69	41-72			1.33-1.60	1.22-1.52
<i>Rsal</i>	<i>Sierra</i>	G	13-36	15-48			0.93-1.33	0.96-1.43		
		LT	11-49	16-37			0.77-1.44	1.06-1.33		
		NV-SM	10-26	33-36			0.89-1.14	1.25-1.32		
	<i>Campiña</i>	M			23-35	17-55			1.12-1.47	1.01-1.33
		T			18-37	25-55			1.06-1.21	1.11-1.34
		NV-C			19-28	22-43			1.07-1.16	1.11-1.43

^aST = Regosol Eútrico (RGeu), Cambisol Eútrico (CMeu), Regosol Calcárico (RGca), y Cambisol Cálculo (CMcc).

^bSMS= [laboreo ligero (LT), pastoreo con ovejas (G), laboreo (T), cubierta de suelo controlada por desbroce (M), y áreas naturales cubiertas por vegetación natural en cada localidad [NV-C (*Campiña*) y NV-SM (*Sierra Morena*)].

Se llevó cabo un análisis canónico discriminante para seleccionar aquellos TRFs más informativos y con mayor poder discriminante entre las diferentes muestras de suelo clasificadas en función del tipo de suelo (RGeu, CMeu, RGca, y CMcc) o del sistema de manejo [laboreo ligero (LT), manejo de cubierta con ganado (G), laboreo (L), manejo de cubierta con desbroce (M), y áreas naturales con vegetación natural en la zona de *Campiña* (NV-C) o *Sierra Morena* (NV-SM)] (Tabla III.2). Para cada agrupación (tipo de suelo y sistema de manejo) se obtuvo un conjunto de TRFs específico que mostró el máximo poder discriminante en función de la enzima de restricción utilizado o de si éstas se consideraron de forma individual o conjunta.

Así, para los enzimas *Mspl* y *Rsal* se seleccionaron una pequeña proporción de TFRs que osciló entre el 16,8 y 21,1%, respectivamente, pero que permitieron la correcta asignación de los 58 suelos en el estudio en función del tipo de clasificación a analizar (Tabla III.2). Este porcentaje fue aún inferior cuando se consideraron los dos enzimas de restricción simultáneamente en un único análisis en el que únicamente se seleccionaron en la función discriminante 19 (7,3%) ó 24 (9,3%) TRFs de un total de 259 cuando las muestras de suelo se clasificaron de acuerdo al tipo de suelo o el sistema de manejo, respectivamente (Tabla III.2).

La función discriminante seleccionada permitió clasificar correctamente la totalidad de las muestras de suelo (100%) en función del tipo de suelo cuando los TRFs analizados se obtuvieron ya fuese utilizando el enzima de restricción *Mspl* de forma individual o combinado con *Rsal* (Tabla III.3). De forma similar, para *Rsal*, el 100% de los suelos muestreados en *Campiña* fueron asignados de forma correcta a su tipo de suelo (RGeu y CMeu), mientras que el porcentaje de éxito fue del 93,75% de los suelos tipo RGeu y el 87,50% para los del tipo CMeu muestreados en *Sierra Morena* (Tabla III.3).

Tabla III.2. Resumen estadístico del análisis de función discriminante de los fragmentos de restricción terminal estandarizado (TRF) que determinan la diversidad de las comunidades bacterianas totales de 46 suelos de olivar y 12 áreas naturales en diferentes tipos de suelo y bajo diferentes sistemas de manejo del suelo (SM) localizados en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (Campaña y Sierra Morena) en Andalucía, sur de España (Figura III.1)

Enzima de Restricción	Clasificación ^a del suelo del olivar ^a	Analizado	En el Modelo	Número de TRFs		Estadística Multivariante					
				Seleccionado en el análisis discriminante por pasos (stepwise) ^b	Wilks' Lambda	Valor F	DF	Den DF	Pr > F	ASCC ^c	
MspI	Tipo de Suelo	150	26	Msp-60, 61, 62, 76, 98, 117, 146, 147, 157, 159, 203, 206, 210, 266, 399, 402, 467	0.000140	20.70	78	87.588	<0.0001	0.90826	
	SMS	150	25	Msp-64, 74, 127, 128, 136, 144, 157, 159, 205, 206, 223, 291, 292, 293, 482, 484	0.000002	14.79	125	142.73	<0.0001	0.89009	
RsaI	Tipo de Suelo	109	23	Rsa-51, 94, 304, 446, 451, 468, 474, 480	0.002655	8.78	69	96.455	<0.0001	0.78258	
	SMS	109	22	Rsa-106, 115, 120, 191, 201, 320, 432, 451, 452, 469, 471, 480, 482	0.000176	6.89	110	156.66	<0.0001	0.77864	
MspI + RsaI	Tipo de Suelo	259	11	Msp-60, 61, 71, 74, 157, 163, 206, 210, 463	0.000095	27.48	72	93.505	<0.0001	0.89880	
	SMS	259	15	Rsa-51, 113, 167, 240, 446, 468, 480	0.000022	14.43	95	170.03	<0.0001	0.85501	
			4	Msp-74, 128, 136, 137, 157, 203, 206, 210, 223, 284, 484, 499							
				Rsa-167, 451, 469							

^a Tipos de suelo evaluados: 16 Regosol Eútrico (RGeu), 16 Cambisol Eútrico (CMeu), 13 Regosol Calcárico (RGca), y 13 Cambisol Calcárico (CMcc). Manejo del suelo MS evaluado: 10 suelos con laboreo ligero (LT) realizados una vez al año normalmente en primavera, 16 suelos con pastoreo con ovejas todo el año (G), 10 suelos con laboreo (T) consistiendo de un pase cruzado con "chisel" o cultivador (aproximadamente 15-20 cm de profundidad) a principio de primavera y dos o tres pases con plancha-niveladora entre finales de primavera y principios de otoño, 10 suelos con cubierta vegetal controlada por desbroce (M) realizada dos o tres veces entre Marzo a Junio, dependiendo de las malas hierbas. Además, se muestrearon 12 suelos de áreas cubiertas con vegetación natural en las proximidades de las fincas de olivar en cada localidad [NV-C (6) y NV-SM (6)].

^b Tamaño de los TRF en pb.

^c Media cuadrada de correlación canónica.

Los TRFs incluidos en la función discriminante para tipos de suelo (*Mspl* y *Rsal* separadas o combinadas *Mspl+Rsal*) se utilizaron posteriormente en un análisis canónico en el que se consideraron las tres primeras funciones canónicas. En las diferentes combinaciones, la primera función canónica explicó >77,5% de la variación, mientras que la segunda y tercera funciones canónicas explicaron entre el 3,42 al 18,85%, y entre el 1,88 al 4,04% de la variación. La Fig. III.2 representa las diferentes muestras de suelo proyectadas en el plano formado por las diferentes combinaciones de las funciones canónicas 1 a 3. Las muestras de suelo se agruparon en función del tipo de suelo (RGeu, CMeu, RGca, y CMcc) para todas las combinaciones de *Mspl* y *Rsal* individuales o combinadas *Mspl+Rsal* (Fig. III.2).

El grado de separación entre los diferentes tipos de suelo se estimó por la distancia de Mahalanobis que estima el cuadrado de la distancia entre las medidas de los valores estandarizados del valor central de cada grupo (tipo de suelo). De acuerdo a lo esperado, la distancia entre las diferentes combinaciones pareadas de tipo de suelo resultaron significativas independientemente de si los TRFs procedían de *Mspl* ($P < 0,0001$), *Rsal* ($P \leq 0,0280$) o *Mspl+Rsal* ($P \leq 0,0001$).

Tabla III.3. Matriz de clasificación^a posterior al análisis discriminante de los suelos de las fincas de olivar y los suelos de las áreas naturales cercanas con diferente tipos de suelo^b localizados en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (*Campiña* y *Sierra Morena*) en Andalucía, sur de España.

Enzima de Restricción	Localidad	Tipo de Suelo	Porcentaje Correcto	RGeu SR $p=0.2759$	CMcc SC $p=0.2759$	CMeu CC $p=0.2241$	RGca CR $p=0.2241$
<i>Mspl</i>	<i>Sierra Morena</i>	RGeu (SR)	100	16	0	0	0
		CMeu (SC)	100	0	16	0	0
	<i>Campiña</i>	CMcc (CC)	100	0	0	13	0
		RGca (CR)	100	0	0	0	13
	Total	100	16	16	13	13	
<i>Rsal</i>	<i>Sierra Morena</i>	RGeu (SR)	93.75	15	0	1	0
		CMeu (SC)	87.50	2	14	0	0
	<i>Campiña</i>	CMcc (CC)	100	0	0	13	0
		RGca (CR)	100	0	0	0	13
	Total	94.83	17	14	14	13	
<i>Mspl + Rsal</i>	<i>Sierra Morena</i>	RGeu (SR)	100	16	0	0	0
		CMeu (SC)	100	0	16	0	0
	<i>Campiña</i>	CMcc (CC)	100	0	0	13	0
		RGca (CR)	100	0	0	0	13
	Total	100	16	16	13	13	

^a Filas: Clasificaciones observadas, columnas: Clasificaciones predichas

^b ST = Regosol Eútrico (RGeu), Cambisol Eútrico (CMeu), Regosol Calcárico (RGca), y Cambisol Calcárico (CMcc)

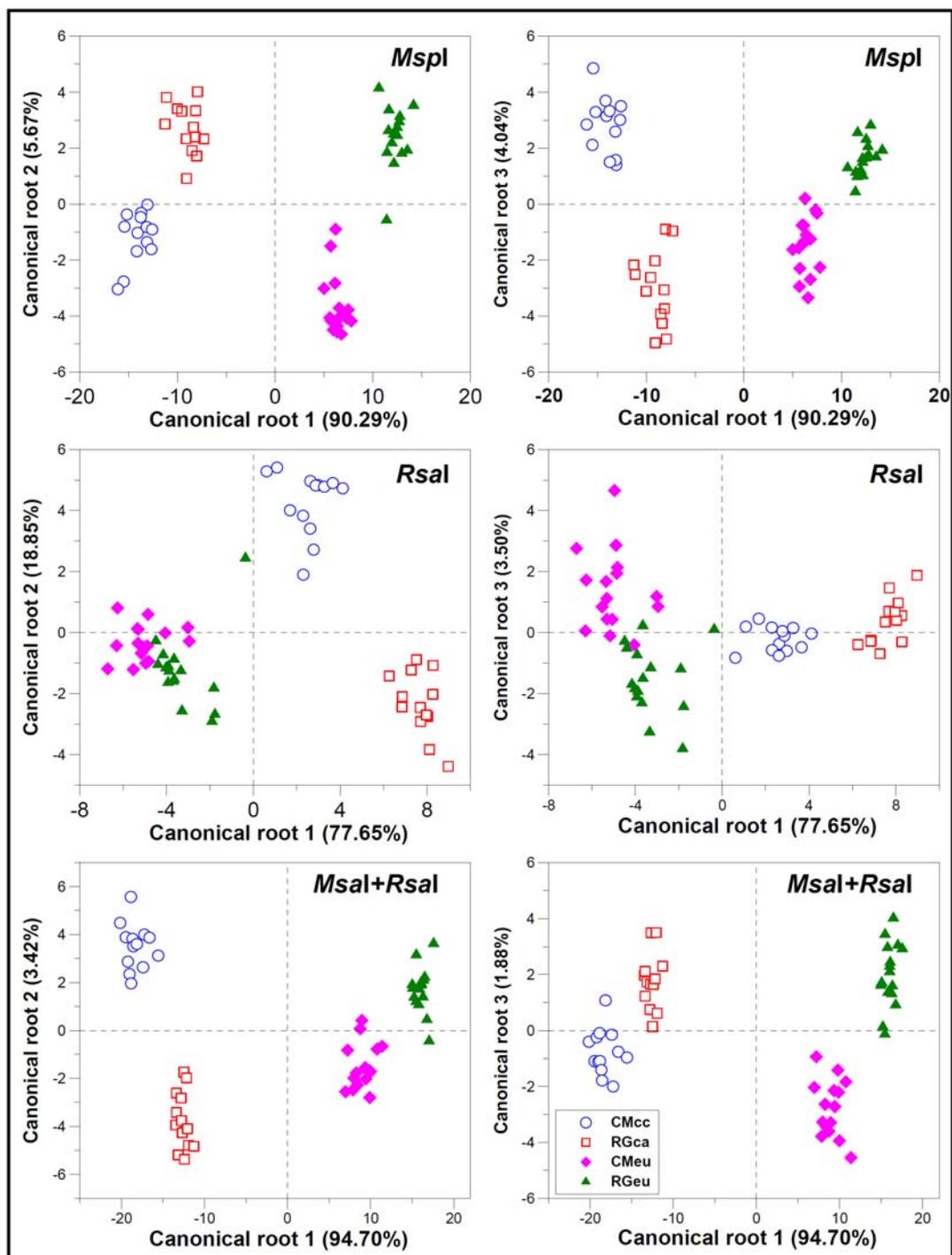


Figura III.2. Análisis canónico de los TRFs de las muestras de suelo para tipos de suelo (*Mspl* y *Rsal* separadas o combinadas) y proyección de las diferentes muestras de suelo en el plano formado por las diferentes combinaciones de las funciones canónicas ('Canonical root') 1 a 3.

De forma similar a lo descrito para los tipos de suelo, la función discriminante obtenida permitió clasificar la totalidad de las muestras de suelo (100%) de acuerdo a su sistema de manejo [laboreo ligero (LT), manejo de cubierta con ganado (G), laboreo (L), manejo de cubierta con desbroce (M), y áreas naturales con vegetación natural en la zona de *Campiña* (NV-C) o *Sierra Morena* (NV-SM)] cuando los TRFs fueron obtenidos a partir únicamente de *Mspl* o combinada con *Rsal*. En este mismo sentido, cuando se utilizaron datos obtenidos con *Rsal*, el 100% de los suelos de zonas de *Campiña* fueron asignados de forma correcta a su sistema de manejo (L, M o NV-C) así como el 100% de las muestras de suelos con manejo de cubierta con ganado (G) de *Sierra Morena*. Sin embargo, el 90,0 y 83,3% de los suelos de *Sierra Morena* con laboreo ligero (LT) y zonas con vegetación natural (NV-SM), respectivamente, fueron asignadas correctamente a su sistema de manejo (Tabla III.4).

En el análisis canónico utilizando los TRFs seleccionados en el modelo discriminante para las distintas combinaciones o enzimas de restricción, la primera función canónica explicó >51,7% de la variación, mientras que la segunda y tercera funciones canónicas explicaron entre el 13,4 al 25,7%, y entre el 8,1 al 13,5% de la variación, respectivamente. La Fig. III.3 representa las diferentes muestras de suelo proyectadas en el plano formado por las diferentes combinaciones de las funciones canónicas 1 a 3. Las muestras de suelo se agruparon en función del tipo de manejo del suelo [laboreo ligero (LT), manejo de cubierta con ganado (G), laboreo (L), manejo de cubierta con desbroce (M), y áreas naturales con vegetación natural en la zona de *Campiña* (NV-C) o *Sierra Morena* (NV-SM)] para todas las combinaciones de *Mspl* y *Rsal* individuales o combinadas *Mspl+Rsal* (Fig. III.3). De acuerdo a lo esperado, la comparación dos a dos de las diferentes combinaciones de sistemas de manejo resultaron estadísticamente significativas ya fuese para TRFs obtenidos de *Mspl* ($P < 0,0001$), *Rsal* ($P \leq 0,0035$) o *Mspl+Rsal* ($P \leq 0,0001$).

Tabla III.4. Matriz de clasificación^a posterior al análisis discriminante de los suelos de las fincas de olivo y los suelos de las áreas naturales cercanas con diferente tipos de manejo (SMS)^b en dos de las zonas más representativas para el cultivo del olivo (*Campaña* y *Sierra Morena*) en Andalucía, sur de España.

Enzima de		Porcentaje	G	LT	NV-SM	M		NV-C
Restricción	SMS	Correcto	$p=0.2759$	$p=.17241$	$p=.10345$	$p=.17241$	T $p=.17241$	$p=.10345$
<i>MspI</i>	G	100	16	0	0	0	0	0
	LT	100	0	10	0	0	0	0
	NV-SM	100	0	0	6	0	0	0
	M	100	0	0	0	10	0	0
	T	100	0	0	0	0	10	0
	NV-C	100	0	0	0	0	0	6
	Total	100	16	10	6	10	10	6
<i>RsaI</i>	G	100	16	0	0	0	0	0
	LT	90.00	1	9	0	0	0	0
	NV-SM	83.33	0	0	5	1	0	0
	M	100	0	0	0	10	0	0
	T	100	0	0	0	0	10	0
	NV-C	100	0	0	0	0	0	6
	Total	96.55	17	9	5	11	10	6
<i>MspI + RsaI</i>	G	100	16	0	0	0	0	0
	LT	100	0	10	0	0	0	0
	NV-SM	100	0	0	6	0	0	0
	M	100	0	0	0	10	0	0
	T	100	0	0	0	0	10	0
	NV-C	100	0	0	0	0	0	6
	Total	100	16	10	6	10	10	6

^a Filas: Clasificaciones observadas, columnas: Clasificaciones predichas

^bSMS= [laboreo ligero (LT), pastoreo con ovejas (G), laboreo (T), cubierta de suelo controlada por desbroce (M), y áreas naturales cubiertas por vegetación natural en cada localidad [NV-C (*Campaña*) y NV-SM (*Sierra Morena*)].

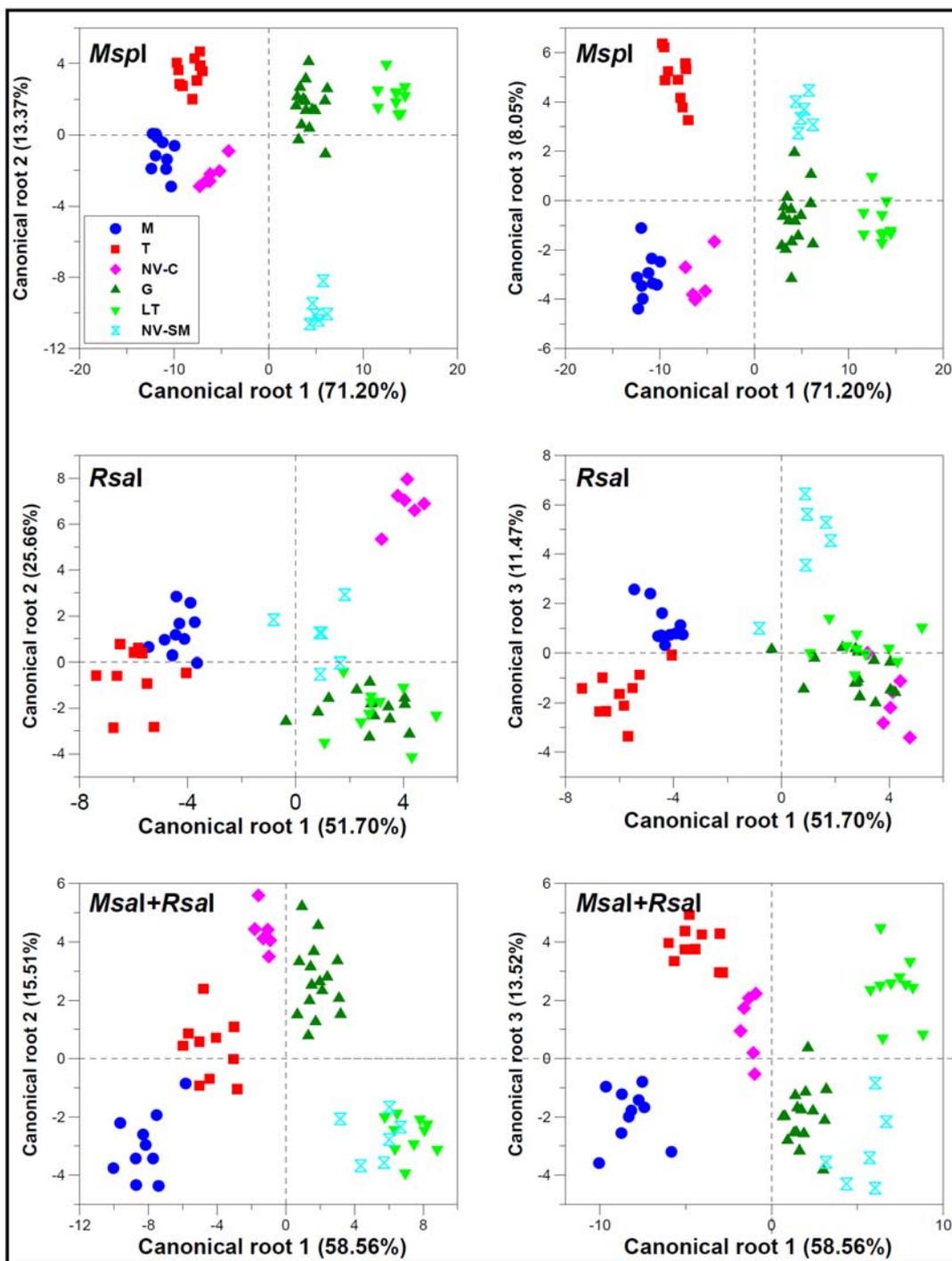


Figura III.3 Análisis canónico de los TRFs de las muestras de suelo para tipos de manejo (*MspI* y *RsaI* separadas o combinadas) y proyección de las diferentes muestras de suelo en el plano formado por las diferentes combinaciones de las funciones canónicas ('Canonical root') 1 a 3.

III.5. DISCUSIÓN

Durante los últimos años, en el olivar español, y fundamentalmente el Andaluz, se han producido notables innovaciones tecnológicas, que confieren confianza al sector productivo respecto de la capacidad de mantener su estabilidad y competitividad para hacer frente al progresivo incremento de exportación de aceite de oliva a nuevos países consumidores. Entre tales innovaciones, que definen la 'Nueva olivicultura', destacan el establecimiento de nuevas plantaciones de mayor densidad (400-600 árboles/ha) y el desarrollo de una industria viverística para obtener plantas de un solo tronco y precoz entrada en producción (Rallo, 1998). Adicionalmente, en la actualidad se están implementando métodos alternativos al laboreo convencional para minimizar la erosión, uno de los problemas fundamentales del olivar en numerosas zonas, incluyendo el laboreo ligero, o el no laboreo combinado con control mecánico (desbrozadora), químico (herbicidas) o animal de las malas hierbas, o manteniendo éstas como cubierta vegetal natural o siembra de una cubierta en otoño y eliminación de éstas en primavera mediante la aplicación de herbicidas, desbroce o pastoreo, entre otros (CAP-JA, 2009; Milgroom *et al.*, 2007). Otras innovaciones han permitido que los sistemas tradicionales de secano sean sustituidos de forma paulatina por plantaciones intensivas con riego por goteo para incrementar y estabilizar la producción. Además, el olivar no ha sido ajeno a la tendencia mundial de uso de estrategias sostenibles de bajo impacto ambiental, de forma que se están promoviendo nuevos sistemas de manejo como la producción integrada y ecológica con objeto de reducir el impacto negativo que tiene el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes.

El excesivo laboreo, o uso de pesticidas y fertilizantes se ha constatado que contribuyen en gran medida a disminuir o incluso eliminar la biodiversidad del suelo debido a una degradación de la vegetación natural causando un impacto directo en los microorganismos y microfauna asociada al suelo rizosférico. En este sentido, existe un gran número de

estudios en diferentes áreas geográficas de ambiente Mediterráneo en los que se relaciona la influencia del manejo del suelo en olivar, incluyendo el empleo de cubiertas vegetales, con la erosión del suelo y/o la disponibilidad y pérdida de agua y nutrientes entre otros (P. ej., Francia *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 1999; Milgroom *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2006). Sin embargo, son pocos los trabajos realizados relacionados con el estudio de la Ecología Microbiana en cultivos leños a nivel mundial, y en el caso del olivo son aún más escasas las investigaciones en relación al efecto de los diferentes sistemas de manejo del cultivo en la biodiversidad microbiana del suelo y la rizosfera. Por este motivo, en la actualidad, en nuestro grupo de investigación se han iniciado investigaciones que se están enfocando al estudio del efecto de los diferentes sistemas de manejo del suelo y del cultivo en: *i*) la composición y diversidad genética, funcional y metabólica de las comunidades bacterianas del suelo y la rizosfera de olivo, y *ii*) el estatus de calidad biológica y fitosanitario de suelos de olivar en Andalucía, por ser la zona más importante del mundo de este cultivo.

Es conocido que en muchos cultivos factores de manejo tales como laboreo, fertilización química, utilización de enmiendas orgánicas, y aplicación de pesticidas entre otros, ejercen un efecto sobre la estructura y diversidad de las comunidades microbianas tanto del suelo como de la rizosfera (Kushwaha y Singh, 2005). No obstante, hasta hace relativamente poco tiempo no se ha determinado el efecto de estas prácticas de manejo del cultivo en las características biológicas de los suelos de olivar en Andalucía, y cuando se han llevado estudios de este tipo han sido en un número muy reducido de olivares o dentro de una misma finca experimental subdividida en zonas con diferentes sistemas de manejo (P.ej., Benítez *et al.*, 2006; García Ruiz *et al.*, 2009; Melero *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009).

En la presente Tesis doctoral se ha determinado el efecto del tipo del suelo y del manejo de éste (laboreo, utilización de cubierta con desbroce o control por ganado, entre otros) en la estructura de las

comunidades bacterianas del suelo en 48 fincas comerciales de olivar diferentes en dos de las zonas principales de olivar y más representativas en Andalucía. De acuerdo a nuestra información, este trabajo representa la primera aproximación a un estudio de la diversidad de comunidades bacterianas en gran extensión y a nivel comercial y no experimental. Nuestros resultados demuestran que el tipo de suelo condicionó de forma significativa la estructura de las poblaciones bacterianas en el suelo de estos olivares, y que grupos taxonómicos operacionales concretos OTUs (ejemplificados por los TRFs) pueden ser asociados con cada uno de los suelos. Este hecho es interesante puesto que los cuatro suelos analizados presentan características fisicoquímicas y biológicas muy próximas con mínimas diferencias (Álvarez *et al.*, 2007; Soriano *et al.*, 2009). Por ejemplo, en estos mismos suelos de *Sierra Morena* el contenido en arena, la respiración del suelo y los niveles de población bacterianos totales fueron significativamente mayores en CMeu que en el RGeu, mientras que el efecto fue el opuesto para el pH y la CIC (Álvarez *et al.*, 2007). Por otro lado, en los suelos de *Campiña* no existieron diferencias significativas en ninguno de los parámetros fisicoquímicos y biológicos evaluados anteriormente citados (Soriano *et al.*, 2009).

Nuestros resultados demostraron que el sistema de manejo del suelo en olivar tiene un efecto significativo en la diversidad y estructura de poblaciones bacterianas totales, ya que los 48 suelos de olivar pudieron ser adecuadamente discriminados en función del tipo de manejo del suelo y a su vez los suelos de olivar pudieron ser diferenciados de zonas con vegetación natural cercanas. Es interesante destacar que los suelos de *Sierra Morena* con vegetación natural o con olivares caracterizados por un bajo nivel de inputs e intensificación presentaron los mayores niveles de los índices de diversidad junto con los suelos de la *Campiña* con presencia de una cubierta vegetal y uso del desbroce para controlar la vegetación. Este hecho puede ser explicado por la baja intensificación y alto aporte de materia orgánica de los suelos de olivar en *Sierra Morena* que presentan una situación en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas muy similares

a los de las zonas naturales cercanas (Álvarez *et al.*, 2007). Por otro lado los menores valores de los índices de diversidad obtenidos en las zonas naturales de la *Campiña* se pueden atribuir al hecho de que dichas zonas no se encuentran cultivadas por corresponder a zonas pobres, pedregosas o de menor interés para ser transformadas en zonas de cultivo (Álvarez *et al.*, 2009).

En este contexto, en otros trabajos, el efecto de diferentes sistemas de manejo y prácticas de cultivo del olivo como tipo de fertilización (orgánica vs convencional), uso de cubiertas y control químico de malas hierbas se han podido asociar a cambios en las características bioquímicas del suelo, así como en algunos parámetros biológicos (P.ej., Bastida *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2006; García-Ruiz *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2009). Así, en un trabajo reciente llevado a cabo en Andalucía en una finca experimental de olivar se demostró que los suelos de olivar con cubierta presentaban mayor biomasa bacteriana y diversidad en comparación con suelos sin cubierta y que en los tratamientos en los que la eliminación de malas hierbas se realizaba con herbicidas fueron en los que se encontraron menores niveles de actividad microbiana y diversidad (Moreno *et al.*, 2009). En el sureste de Italia la utilización en el riego del agua residual de la molienda de olivo se ha constatado que tiene un efecto significativo y consistente en las comunidades microbianas del suelo y rizosfera debido a alteraciones de las propiedades físico-químicas del suelo, condiciones oxidativas, competición por nitrógeno, disponibilidad de fenoles minerales y alteración de las fuentes de carbono (Karpouzias *et al.*, 2009, 2010). Asimismo, en el sureste de Italia se ha demostrado que los microorganismos del suelo responden de forma significativa a la aplicación de un manejo sostenible (caracterizado por no laboreo, fertilización química integrada, aporte de materia orgánica, riego por goteo, cubiertas vegetales e incorporación de material vegetal de poda). Ya que este sistema de manejo mostró mayores niveles de poblaciones totales de bacterias cultivables, principalmente relacionadas con el proceso del ciclo del nitrógeno, así como una mayor diversidad genética, metabólica y

funcional de los microorganismos del suelo en relación a otros sistemas de manejo más intensivos o tradicionales lo cual puede proporcionar evidentes beneficios para el rendimiento y calidad del olivo (Sofo *et al.*, 2010).

En nuestro estudio solo comparamos olivares bajo sistema de producción orgánico o ecológico con diversos sistemas de manejo del suelo. Sin embargo es de destacar el hecho de que el análisis canónico discriminante realizado con 58 suelos permitió identificar ciertas poblaciones o grupos taxonómicos bacterianos concretos (OTUs) que están asociados diferencialmente a tipos de suelo y/o sometidos a ciertos manejos, por lo que si dichos grupos bacterianos son caracterizados a nivel de especie o aislado podrían actuar como indicadores biológicos de dichos sistemas de manejo. En este sentido el estudio de la biodiversidad microbiana del suelo y rizosfera de olivar mediante esta metodología FT-RFLP y otras similares permite establecer claramente diferencias entre sistemas de manejo y por tanto evaluar el desarrollo, perturbación y madurez de un agroecosistema. La aplicación de esta metodología y otras de mayor poder de discriminación como el análisis metagenómico de las comunidades rizosféricas en olivar desde un punto de vista de análisis estructural y funcional, permitiría mejorar la toma de decisiones para la selección de sistemas óptimos de manejo o adoptar nuevas técnicas capaces de mejorar el sistema productivo del olivo, además de preservar la calidad, salud y fertilidad del suelo (Anderson, 2003; Govaerts *et al.*, 2008; Hochstrat *et al.*, 2006; Kushwaha y Singh, 2005; Lal, 2004).

III.6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, R. y Steinbach, H.C. 2009. A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas. *Soil & Tillage Research* 104: 1-15.
- Alvarez, S., Soriano, M.A., Landa, B.B. y Gómez, J. 2007. Soil properties in organic olive groves compared with that in natural areas in a mountainous landscape in southern Spain. *Soil Use and Management* 23: 404-416.
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agriculture Ecosystems & Environment* 98: 285-293.
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J.L., Ros, M., García, C. y Hernández, T. 2008. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology* 40: 318-329.
- Beaufoy, G. 2001. WWF Europe/Birdlife International, Brussels, pg. 16
- Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L. y Trujillo, L. 2003. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 638-644.
- Benítez, E., Nogales, R., Campos, M. y Ruano, M. 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32: 221–231.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. y Smalla, K. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 3328-3338.
- Briée, C., Moreira, D. y García, P. 2007. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology* 158: 213-227.
- Burke, D.J., Kendall, J., Martin, P., Rygiewicz, T. y Topa, A.M. 2005. Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled root samples: Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1638-1694.
- Consejería de Agricultura y Pesca. 2007. El olivar Andaluz. Servicio de Publicaciones y Divulgación: Sevilla, España.

- CAP-JA. 2009. El olivar Andaluz. Consejería de Agricultura y Pesca (ed.). Servicio de Publicaciones y Divulgación: Sevilla, España.
- Carson, J.K., Rooney, D., Gleeson, D.B y Clipson, N. 2007. Altering the mineral composition of soils causes a shift in microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 414-423.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Koint, I., Rodriguez-Varela, F. y Pedrosalio, C. 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 4: 338-348.
- Dunbar J, Ticknor, L.O. y Kuske, C.R. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2943–2950.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O. y Kuske, C.R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 190-197.
- FAO, 2006. Statistical databases. Agriculture Data Collection (Primary Crops). <http://faostat.fao.org/>
- Francia, J.R., Durán Zuazo, V.H. y Martínez-Raya, A. 2006. Environmental impact from mountainous olive orchards under different soil-management systems (SE Spain). *Science of the Total Environment* 358: 46-60.
- García-Ruíz, R., Ochoa, V., Viñegla, B., Hinojosa, M.B., Peña-Santiago, R., Liébanas, G., Linares, J.C. y Carreira, J.A. 2009. Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive farming: Influence of seasonality and site features. *Applied Soil Ecology* 41: 305-314.
- Garveba, P., van Veen, J.A. y van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243-270.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. y Ball, A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of total and active communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1800-1809.

- Gómez, J.A., Giráldez, J.V., Pastor, M. y Fereres, E. 1999. Effect of tillage method on soil physical properties, infiltration and yield in an olive orchard. *Soil and Tillage Research* 52: 167-175.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Sayre, K.D., Crossa, J., Lichter, K., Troch, V., Vanherrick, K., De Corte, P. y Deckers, J. 2008. Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on selected soil micro-flora groups in the subtropical highlands. *Applied Soil Ecology* 38: 197-210.
- Graf, A. y Conrad, R. 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 401-415.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L. y Sessitsch, A. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5057–5065.
- Hartmann, M. y Widmer, F. 2008. Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 249-260.
- Hartmann, M., Fließbach, A., Oberholzer, H.R. y Widmer, F. 2006. Ranking the magnitude of crop and farming system effects on soil microbial biomass and genetic structure of bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 378-388.
- Hernández, A.J., Lacasta, C. y Pastor, J. 2005. Effects of different management practices on soil conservation and soil water in a rainfed olive orchard. *Agricultural Water Management* 77: 232-248.
- Héry, M., Herrera, M., Vogel, T.M, Normand, P. y Navarro, E. 2005. Effect of carbon and nitrogen input on the bacterial community structure of neocaledonian nickel mine spoils. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 333-340.
- Hiddink, G.A., Termorshuizen, A.J., Raaijmakers, J.M. y van Bruggen, A.H.C. 2005. Effect of mixed and single crops on disease suppressiveness of soils. *Phytopathology* 95: 1325-1332.
- Hochstrat, R., Wintgens, T., Melin, T. y Jeffrey, P. 2006. Assessing the European wastewater reclamation and reuse potential – a scenario analysis. *Desalination* 188: 1-8.
- International Olive Oil Council, 2006. World olive oil. www.internationaloliveoil.org, Madrid.
- Johnson, M.J., Lee, K.Y. y Scow, K.M. 2003. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma* 114: 279-303.

- Kaplan, C.W. y Kitts, C.L. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1777-1786.
- Karpouzas, D.G., Rousidou, C., Papadopolou, K., Bekris, F., Zervakis, G.I., Singh, B.K. y Ehalotis C. 2009. Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of nitrogen fertilization, on the structure of rhizosphere-soil fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 70: 388-401.
- Karpouzas, D.G., Ntougias, S., Iskidou, E., Rousidou, C., Papadopolou, K.K., Zervakis, I.G. y Ehalotis, C. 2010. Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology* 45: 101-111.
- Khattree, R. y Naik, D. N. 2000. Multivariate data reduction and discrimination 13 with SAS software. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Kushwaha, C.P. y Singh, K.P. 2005. Crop productivity and soil fertility in a tropical dryland agro-ecosystem: Impact of residue and tillage management. *Experimental Agriculture* 41: 39-50.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123: 1-22.
- Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder, K.L., Allende-Molar, R. y Weller D.M. 2006. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 351-368.
- Larkin, R.P. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1451-1466.
- Lazzaro, A., Widmer, F., Sperisen, C. y Frey, B. 2008. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 143-155.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. y Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Lukow, T., Dunfield, P.F. y Liesack, W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 241-247.
- McSpadden-Gardener, B.B. y Weller, D.M. 2001. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4414-4425.

- Melero, S., López-Garrido, R., Murillo, J.M. y Moreno, F. 2009. Conservation tillage: Short – and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil & Tillage Research* 104: 292-298.
- Milgroom, J., Soriano, M.A., Garrido, J.M., Gómez, J.A. y Fereres, E. 2007. Influence of the shift from conventional organic olive farming on soil management and erosion risk in Southern Spain. *Renewable Agriculture and Food Systems* 22: 1-10.
- Morales, S.E. Mouser, P.J. Ward, N., Hudman, S.P., Gotelli, N.J., Ross, D.S. y Lewis, T.A. 2006. Comparison of bacterial communities in New England sphagnum bogs using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microbial Ecology* 52: 34-44.
- Moreno, B., Gracia-Rodríguez, S., Cañizares, R., Castro, J. y Benítez, E. 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystem & Environment* 131: 333-339.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. y Timmis, K. N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2: 39-50.
- Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J. y Widmer, F. 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2577-2587.
- Rallo, L. 1998. El olivar y la innovación tecnológica. En: *Gestión Agraria Integrada en olivar*. Libros S.A. Madrid, pgs. 471-487.
- Runnels, C.N. y Hansen, J. 1986. The olive in the prehistoric aegean: The evidence for domestication in the early bronze age. *Oxford Journal of Archeology* 5: 299-308.
- Shannon, C.E. y Weaver, W. 1963. *The mathematical theory of communication*, University of Illinois Press, Urbana.
- Shen, W., Xiangui, L., Nan, G., Huayong, Z., Rui, Yin., Weiming, S. y Zengqiang, D. 2008. Land use intensification affects soil microbial populations, functional diversity and related suppressiveness of cucumber Fusarium wilt in China's Yangtze river delta. *Plant Soil* 306: 117-127.
- Sofo, A., Palese, A.M., Casacchia, T., Celano, G., Ricciuti, P., Curci, M., Crecchio, C. y Xiloyannis C. 2010. Genetic, functional, and metabolic responses of soil microbiota in a sustainable olive orchard. *Soil Science* 175: 81-88.
- Soriano, M.A., Álvarez, S. y Gómez, J.A. 2009. Development of a soil degradation assessment tool for organic olive groves in southern Spain. *Catena* 79: 9-17.

- Soriano, M.A., Álvarez, S., Landa, B.B. y Gómez, J.A. 2010. Soil properties and erosion risk in commercial organic olive-orchards under different soil-management systems in a rolling landscape in Southern Spain. *Soil Science Society of America Journal*, aceptado.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L. y Flynn, S.J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13: 109-122.
- Villalobos, F.J., Testi, L., Hidalgo, J., Pastor, M. y Orgaz, F. 2006. Modelling potential growth and yield of olive (*Olea europaea* L.) canopies. *European Journal of Agronomy* 2: 296-303.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Widmer, F., Rasche, F., Hartmann, M. y Fließbach, A. 2006. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Applied Soil Ecology* 33: 294-307.
- Zhou, J.Z; Xia, B.C., Treves, D.S., Wu, L.Y., Marsh, T.L., O'Neil, R.V., Palumbo A.V. y Tiedje, J.M. 2003. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 326-334.

CAPÍTULO IV

IV

Influencia del material vegetal de origen y genotipo de la planta sobre la estructura y densidades de población de las comunidades bacterianas en el sistema radical de plantones de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*)

En este capítulo se recogen los resultados relativos al objetivo segundo de esta Tesis Doctoral, en el cual se pretendía:

Determinar el efecto del material vegetal de origen y del genotipo de plantones certificados de variedades olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) estructura inicial y densidades de población de las comunidades bacterianas en el sistema radical y los cambios producidos en aquéllas después de 1,5 años de interacción con un suelo de cultivo seleccionado *ad hoc*.

IV.1. RESUMEN

Entre los árboles cultivados, el olivo es uno de los cultivos con mayor riqueza y variabilidad genética. La especie vegetal, los genotipos o cultivares y los estadíos de crecimiento de las plantas huéspedes, son considerados los principales factores bióticos que pueden determinar la estructura de las comunidades bacterianas del sistema radical de las plantas. Por tanto, la diversidad genética y origen del material vegetal de propagación del olivo cultivado, pueden ser factores importantes que influyen la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en la rizosfera y endosfera del olivo. El objetivo general del presente estudio fue determinar la influencia específica del cultivar de plantones de olivo certificados, el efecto del vivero de origen del material vegetal, así como el efecto del tiempo de crecimiento en un suelo natural sobre las comunidades bacterianas totales y cultivables de la rizosfera y endosfera utilizando para ello un análisis basado en técnicas cultivo-dependientes e independientes. Los resultados indican que el genotipo del olivo tiene una marcada influencia en la densidad inicial de población de bacterias cultivables totales (BCT) y *Pseudomonas* spp. (Ps) en la rizosfera y endosfera de los diferentes plantones de olivo que a su vez variaron significativamente en función del vivero de origen muestreado (REY, COT y PC); siendo los cultivares Arbequino y Frantoio procedentes del vivero PC los que presentaron las mayores densidades de población. Asimismo, las poblaciones de BCT y Ps fluorescentes en la rizosfera y endosfera variaron significativamente en función del tiempo de crecimiento en condiciones de campo en un suelo natural, el cultivar de origen y sus interacciones, manteniéndose unos niveles de población estables o con tendencia creciente durante los 18 meses de duración del experimento. El análisis FT-RFLP de las comunidades bacterianas totales de la rizosfera agrupó a los diferentes cultivares de olivo de acuerdo al vivero de procedencia en dos grupos principales I (REY) y II (COT y PC). Así mismo, el análisis FT-RFLP de las comunidades bacterianas totales de la rizosfera de olivo de

seis cultivares de olivo muestreados en distintos tiempos de crecimiento diferenció los tratamientos en primer lugar en función del tiempo de muestreo y en segundo lugar en función del genotipo de olivo, indicando que la estructura de población bacteriana en la rizosfera de olivo está determinada fuertemente en el momento del transplante por el genotipo de procedencia, posteriormente existe cierta homogeneización en la diversidad de la estructura de las comunidades bacterianas tras 12 meses después del transplante a un suelo natural, tras lo cual el efecto marcado del genotipo se vuelve a manifestar a los 18 meses de crecimiento, fundamentalmente en los cultivares Arbequina y Picual.

IV.2. INTRODUCCIÓN

Se sabe que las plantas ejercen un fuerte efecto sobre la abundancia, diversidad y actividad de los microorganismos del suelo. Las interacciones planta-microorganismo en la rizosfera y endosfera han sido objeto de un número considerable de estudios debido a que se ha demostrado que el sistema radical de las plantas puede constituir una importante fuente de microorganismos útiles para su uso en la agricultura incluyendo agentes de biocontrol de fitopatógenos así como rizobacterias promotoras del crecimiento. La rizosfera se ha definido como el compartimento de suelo que está influenciado por las raíces de las plantas y por los compuestos que éstas liberan (Sorensen y Sessitch, 2007). Las bacterias endofitas, se consideran poblaciones bacterianas que pueden ser originadas y seleccionadas por la planta a partir de la rizosfera, y pueden ser definidas como aquellas bacterias que pueden colonizar el tejido interno de las plantas sin que éstas muestren síntomas y signos de infección o efectos negativos sobre su crecimiento (Holliday, 1989). Las bacterias endofíticas son omnipresentes en la mayoría de las especies de plantas residiendo latentemente o colonizando activamente el tejido interno

de su huésped y desarrollando un amplio rango de interacciones beneficiosas diversas (Ryan *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008).

El tipo de suelo, el genotipo de la planta, así como el estado de crecimiento de las mismas, son considerados los principales factores bióticos y abióticos que controlan la estructura (abundancia y diversidad) de las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera. Sin embargo, la importancia relativa de cada uno de estos factores en influenciar y gobernar la composición de las comunidades bacterianas de la rizosfera varía de acuerdo al estudio. En este contexto, se ha documentado en algunos estudios que existe una mayor influencia del tipo del suelo que del genotipo de la planta sobre la composición de las comunidades bacterianas (i.e., Dalmastrri *et al.*, 1999; Kowalchuk *et al.*, 2002; Marschner *et al.*, 2001; Rengel *et al.*, 1996; Sanguin *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2007). En estas investigaciones, se ha considerado que diferentes tipos de suelos muestran características físico-químicas distintivas incluyendo diferencias en el tamaño y distribución de las partículas, pH, aireación etc., las cuales influyen directamente las comunidades microbianas al proveer un hábitat específico e indirectamente al influenciar la liberación de los exudados de las raíces de las plantas (Garveba *et al.*, 2003). En contraste, en otros estudios, la especie de la planta es considerada uno de los factores más importantes que condiciona las comunidades bacterianas de la rizosfera mostrando un mayor efecto e influencia sobre la estructura y composición de éstas que el tipo de suelo (e.g., Appuhn *et al.*, 2006; Grayston *et al.*, 1998; Lemanceu *et al.*, 1995; Marschner *et al.*, 2004; Merbach *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1989; Wieland *et al.*, 2001). Por lo anterior, se considera que los depósitos y exudados de las raíces de las plantas forman un microambiente único que tiene un impacto directo en las condiciones físico-químicas del suelo así como en la actividad biológica y composición de las comunidades bacterianas ya que los exudados de la raíz representan una importante fuente de sustratos disponibles para los microorganismos dando lugar al nicho ecológico único que conforman la

rizosfera y endosfera (Filion *et al.*, 2008; Raaijmakers *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009).

Es también conocido que las especies de plantas desempeñan un papel fundamental en la dinámica y estructura de las comunidades bacterianas (Ahn *et al.*, 2007; Berg *et al.*, 2005; Germida *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2008; Marilley y Aragno, 1999; Mendes *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2005). Así, los resultados de varias investigaciones han aportado evidencias que revelan que las raíces difieren de acuerdo a la especie de la planta, el genotipo, el cultivar, así como del estado de crecimiento y desarrollo de las mismas. Igualmente, se ha demostrado que existe una variación natural en los patrones y calidad de los exudados en las raíces que está genéticamente regulado en las plantas, que pueden ser altamente específicos para una especie de planta o incluso para un genotipo o cultivar en particular, sugiriendo que esas diferencias en los patrones de exudación explican la influencia específica del genotipo de la planta sobre la composición de las comunidades microbianas de la rizosfera y endosfera (Adams *et al.*, 2002; Appuhn *et al.*, 2006; Kowalchuck *et al.*, 2002; Marschner *et al.*, 2001, 2005; Meredith *et al.*, 2009; Smalla *et al.*, 2001; Zinniel *et al.*, 2002). De este modo, en los últimos años, diversos estudios han obtenido evidencia experimental acerca de la influencia selectiva de genotipos de plantas específicos, cultivares e incluso ecotipos, sobre la composición de las comunidades bacterianas en la rizosfera y endosfera (De Long *et al.*, 2002; Marschner *et al.*, 2001; 2005; 2006; Mazzola *et al.*, 2004; Micallef *et al.*, 2009; Rumberger *et al.*, 2004; 2007). Por otra parte, investigaciones recientes cuyo objetivo fue analizar componentes microbianos específicos de la rizosfera tales como cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes productoras del antibiótico 2,4-diacetilfluoroglucinol han demostrado que ciclos sucesivos de monocultivo de diferentes especies de plantas (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005; De La Fuente *et al.*, 2006; Landa *et al.*, 2003; Mazzola *et al.*, 2004; Okubara *et al.*, 2004) o de diferentes genotipos (cultivares) de una especie de planta determinada (Landa *et al.*, 2002; 2006; Mazzola *et al.*, 2002; Notz *et al.*, 2001; Okubara y Bonsall,

2008; Picard *et al.*, 2004) enriquecen de forma diferencial y sustentan poblaciones específicas de este grupo de bacterias.

En este contexto, las especies de plantas leñosas de gran longevidad son un caso muy particular de monocultivo. Entre las especies leñosas cultivadas, el olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) es una de las especies de mayor longevidad y riqueza en biodiversidad genética (Rallo y Martín, 2000). Por miles de años, el olivo ha sido culturalmente y económicamente el principal cultivo oleaginoso en la Cuenca del Mediterráneo, donde actualmente existen cerca de 9.5 millones de ha de cultivo, representando el 95% del total del área cultivada en el mundo (Issaoui *et al.*, 2008). Los diferentes cultivares de olivo muestran un amplia gama de variabilidad genética para un gran número de caracteres agronómicos incluyendo tamaño del fruto, contenido de aceite y diferente grado de adaptabilidad a estreses bióticos y abióticos.

En los últimos años, las herramientas moleculares han sido extensamente utilizadas para investigar la diversidad genética, relación filogenética e identificación de variedades tanto de formas cultivadas como silvestres de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) (e.g., Angiolillo *et al.*, 1999; Belaj *et al.*, 2002; 2007; Cordeiro *et al.*, 2008). Los resultados de estas investigaciones han mostrado que a nivel mundial, la región con mayor diversidad genética del olivo corresponde a la parte Oeste de la Cuenca del Mediterráneo, principalmente la Península Ibérica y el Magreb (Lumaret *et al.*, 2004). Dentro de la Cuenca del Mediterráneo, España es el primer productor de aceite de olivo en el mundo, y Andalucía, la región sur del país, es considerada la principal zona de producción con 1.5 millones de ha, lo cual representa el 62% del total del área cultivada en España y el 39% de la producción total de aceite de oliva en el mundo (Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2007). En Andalucía siete variedades de olivo (Picual, Lechín de Sevilla, Hojiblanca, Picudo, Manzanilla de Sevilla, Verdial de Huelva y Nevadillo Negro) constituyen el 90% de la superficie cultivada, mientras que otro 5% está constituido por ocho variedades (Arbequina, Gordal Sevillana, Aloreña,

Verdial de Vélez-Málaga, Lechín de Granada, Pico Limón, Manzanilla Serrana, y Alameño Blanco) (CAP-2003).

La variedad predominante en Andalucía es 'Picual', con 857.746 ha cultivadas (58,2% de la superficie total), siendo también la variedad más extendida, empleándose en gran medida en nuevas plantaciones por su productividad y alto rendimiento graso. Su importancia en el total del olivar andaluz viene dada por el peso que tiene en las provincias de Jaén, donde supone casi la totalidad del olivar (98,6% de la superficie), Granada (69,3%) y Córdoba (39,8%) (CAP-2003). Sin embargo, actualmente, otros cultivares de olivo han sido introducidos procedentes de otras regiones y países, tales como el cultivar Catalán Arbequina y el cultivar Italiano Frantoio, que están siendo actualmente introducidos en nuevas plantaciones o utilizados para reemplazar árboles infectados por Verticilosis, la enfermedad más severa de este cultivo en el mundo (Paz-Aguilera *et al.*, 2005). Esto es debido a que estos cultivares se consideran tolerantes ya que presentan menor incidencia y severidad de síntomas por la infección del patotipo defoliante de *V. dahliae*.

En Andalucía, el establecimiento de nuevas plantaciones se ha incrementado de forma constante durante la última década, asociado a la innovación y mejoramiento de las técnicas de propagación (tales como la propagación de estaquillas semileñosas bajo nebulización en túneles) que facilita la rápida producción de plantones comerciales homogéneos (Caballero y del Río, 1999). En los viveros de Andalucía, el proceso para obtener los plantones de olivo a partir de estaquillas semileñosas con algunos primordios de raíces requiere de largos periodos de enraizado en substrato artificial compuesto principalmente por diferentes mezclas de turba y perlita. Consecuentemente, para obtener plantones comerciales de 8 a 10 meses, las plantas se cultivan de forma individual en bolsas de plástico con 2 o 3 litros de suelo natural o una mezcla de turba y suelo en bolsas de plástico durante varios meses.

A partir del conocimiento existente sobre la influencia del genotipo de la planta en modelar la estructura de las comunidades bacterianas, en

este estudio, planteamos la hipótesis de que diferentes cultivares de plántones de olivo pueden albergar comunidades bacterianas distintivas en su rizosfera y endosfera. Estas comunidades bacterianas pueden diferir desde los estadios iniciales de propagación vegetativa en el vivero de acuerdo al genotipo de la planta madre de origen y el sustrato artificial o suelo donde los plántones son propagados; posteriormente, estas comunidades pueden ser moldeadas durante su establecimiento en el campo donde cada genotipo puede seleccionar, enriquecer y sustentar poblaciones específicas de rizobacterias a través de los años de crecimiento en los diferentes suelos naturales y diferentes condiciones ambientales. En este escenario, para avanzar en nuestro conocimiento en la influencia del genotipo de la planta sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera se utilizó un enfoque cultivo-dependiente y cultivo-independiente para estudiar comparativamente las comunidades bacterianas de los cultivares de olivo más comúnmente utilizados en Andalucía, España.

Los objetivos específicos de la presente investigación fueron: i) explorar la influencia selectiva de plántones certificados de diferentes cultivares de olivo procedentes de diferentes viveros sobre la composición de las comunidades bacterianas totales de la rizosfera y endosfera, ii) investigar los cambios producidos sobre la estructura de la composición de las comunidades bacterianas iniciales de la rizosfera y endosfera de los cultivares de olivo después de 1,5 años de crecimiento bajo condiciones naturales en un suelo natural seleccionado *ad hoc* y iii) caracterizar la densidad de población de bacterias heterotróficas totales y de *Pseudomonas* fluorescentes cultivables más abundantes asociadas con estos cultivares. Hasta donde sabemos, esta investigación representa el primer estudio comparativo de la estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera en plántones certificados de diferentes cultivares comerciales de olivo en Andalucía, España.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1. Cultivares de olivo

Se utilizaron plántones de olivo de nueve meses de edad procedentes de clones de planta madre certificada de seis variedades: Picual (P), Arbequina (A), Frantoio (F), Hojiblanca (HB), Picudo (Pi) y Manzanillo (M), que fueron adquiridos de diferentes viveros comerciales en España: 1) REYPRA S.L., Reyes y Prada, Écija, Sevilla (REY); 2) COTEVISA, Comercial Técnica y Viveros S.L. Valencia, Valencia (COT) y; 3) Plantas Continental S.A. Posadas, Córdoba (PC). Todas las plantas muestreadas se originaron a partir de estaquillas semileñosas bajo túneles de nebulización y tenían una edad y estado de crecimiento similar tras 8 meses de crecimiento en una mezcla de suelo y turba bajo condiciones ambientales de campo.

IV.3.2. Efecto del tiempo de crecimiento y cultivar de olivo sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera

Para el experimento se usaron plántones de olivo de nueve meses de edad de seis cultivares diferentes (A, F, HB, M, P, y Pi) provenientes del vivero REY. Un suelo arcilloso sin historial de cultivo reciente por lo menos en los últimos 10 años fue seleccionado *ad hoc* para evaluar la interacción con los cultivares de olivo. Los análisis fisicoquímicos fueron determinados según la metodología descrita previamente (Álvarez *et al.*, 2007) por el Laboratorio oficial Agroalimentario de Córdoba (Córdoba, España) y fueron: 11.96 meq/100 g de capacidad de intercambio catiónico; 1.34% de C orgánico; 0.07% de N orgánico; pH en H₂O 8.55; pH en ClK 7.75; contenido del 15.6% de arcilla, 46.6% de arena y 37.8% de arena fina.

Los plántones de cada cultivar de olivo se extrajeron cuidadosamente de la maceta del vivero, las raíces se agitaron para

remover la mayoría del sustrato y se lavaron en agua destilada estéril. Posteriormente, los plantones fueron trasplantados en macetas conteniendo 2 kg del suelo seleccionado. Todas las macetas fueron colocadas en un umbráculo en condiciones naturales por 18 meses. Por cada cultivar se realizaron 18 repeticiones donde cada maceta fue considerada una repetición. Las plantas fueron regadas de acuerdo a sus requerimientos y fueron fertilizadas con 100 ml de una solución fertilizante (Haifa Chemicals, Ltd., Haifa, Israel, 20-5-32 de N-P-K + micronutrientes) cada 6 meses. Después de 12 y 18 meses de crecimiento, 6 plantas de cada cultivar de olivo seleccionadas al azar fueron muestreadas y se determinaron las comunidades bacterianas totales de la rizosfera así como las poblaciones bacterianas heterotróficas cultivables más abundantes de la rizosfera y endosfera y poblaciones cultivables de *Pseudomonas* fluorescentes como se describe en el apartado IV.3.3.

IV.3.3. Extracción de las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera

De cada una de las plantas se extrajo el sistema radical intacto, se agitó cuidadosamente de forma manual para remover todo el suelo-sustrato con la excepción del que está adherido íntimamente a las raíces de las plantas de forma natural. Posteriormente, las raíces se cortaron en fragmentos de 1- 2 cm. Las comunidades bacterianas de la rizosfera se obtuvieron agitando vigorosamente 2 g de raíces en 20 ml de agua destilada estéril durante 10 min y posteriormente se sometió a un baño de ultrasonido (Ultrasons, JP Selecta SA, Barcelona, España) por 10 min. La suspensión resultante se consideró que contenía las poblaciones bacterianas de la rizosfera.

Para la extracción del ADN del suelo rizosférico, se recogió el “pellet” o precipitado a partir de las suspensiones de la rizosfera después de tres pasos de centrifugación consecutiva (1 ml cada paso) a 11,000 x g

por 4 min. Para las comunidades bacterianas de la endosfera, los fragmentos de raíz (2 g) fueron esterilizados superficialmente con una solución al 2% de hipoclorito de sodio (NaOCl) durante 3 min y lavados tres veces con agua destilada estéril. Las muestras de raíz fueron trituradas utilizando un molino (Bosh MMB 2000, Robert Bosch España, S.A., Madrid, España) con 100 ml de agua destilada estéril. La suspensión resultante se consideró que contenía las comunidades bacterianas de la endosfera. Para confirmar que la esterilización superficial fue alcanzada en forma exitosa, se sembraron alícuotas de 100 µl del agua destilada estéril usada en el último paso de lavado de las muestras de las raíces en medio R2A agar de bajo contenido nutritivo (Biolife Italiana S.r.l. Milan, Italia). Las placas fueron examinadas para determinar la existencia de crecimiento bacteriano después de un periodo de incubación a 28°C durante 3 días.

IV.3.4. Determinación de las densidades de población de las bacterias heterotróficas cultivables totales y *Pseudomonas* fluorescentes más abundantes

La densidad de población de las bacterias heterotróficas totales y *Pseudomonas* spp. fluorescentes más abundantes en la rizosfera y endosfera se determinaron utilizando el método de dilución terminal del punto final (Landa *et al.*, 2003, 2006). Brevemente, las suspensiones de la rizosfera y endosfera obtenidas de la forma anteriormente descrita fueron diluidas en serie (1:3) en una microplaca de 96 pocillos los cuales se llenaron previamente con 200 µl de agua destilada estéril por pocillo. Posteriormente, 50 µl de cada dilución fue transferido a un pocillo de una microplaca conteniendo 200 µl de 1/10x de medio caldo soja triptona [Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.] suplementado con cicloheximida (100 µg/ml) (1/10x TS⁺ caldo) para estimar las poblaciones heterotróficas cultivables totales (BCT) o 1/3x de medio B de King (1/3x KMB) suplementado con ampicilina (40 µg/ml), cloranfenicol (13 µg/ml) y

cicloheximida (100 µg/ml) (1/3x KMB⁺⁺⁺) para estimar las poblaciones de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Ps) (Landa *et al.*, 2003).

Las microplacas se incubaron a 28°C en oscuridad y el crecimiento fue medido utilizando un fluoroespectrómetro Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España) después de 72 h; una densidad óptica a 595 nm (OD_{590nm}) $\geq 0,09$ se consideró como crecimiento positivo. El último pocillo de la dilución terminal presentando crecimiento (TDC) se utilizó para calcular la densidad de población de BCT y Ps (Landa *et al.*, 2003, 2006).

IV.3.5. Extracción de ADN de la rizosfera y análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal fluorescente (FT-RFLP)

La extracción del ADN de la rizosfera se realizó utilizando el kit de extracción MoBio UltracleanTM soil DNA (MoBio laboratories, Inc; Carlsbad, CA, EEUU). Para este propósito, el ADN se obtuvo a partir de los “pellets” obtenidos de la rizosfera (aproximadamente 200 mg) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones: i) las muestras de la rizosfera se agitaron para disgregar las partículas de suelo y células bacterianas en el sistema FastPrep-24 (MP Biomedicals, Inc. Francia) a 6,0 m/s por 40 s y ii) se utilizó agua para la elución del ADN en el paso final en lugar de la solución proporcionada por el fabricante. Se evaluó la integridad y calidad del ADN extraído y se cuantificó mediante tinción con bromuro de etidio utilizando el Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric assay (Molecular Probes Inc., Leiden, Holanda) (Landa *et al.*, 2006) y con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). El ADN fue utilizado directamente para su amplificación.

La diversidad genética de las comunidades bacterianas totales en la rizosfera de cada cultivar de olivo se investigó mediante el análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento terminal fluorescente (FT-RFLP)

de la secuencia amplificada del 16S ADNr. Los genes 16S ADNr se amplificaron a partir del ADN total de la rizosfera mediante los iniciadores 8F y 1492R (Weisburg, et al. 1991) en un volumen de reacción de 25 μ l conteniendo 2.5 μ l del ADN extraído de la rizosfera, 2.5 μ l del buffer de reacción 10x sin Mg (BioLine, Londres, Reino Unido), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de cada iniciador, 0,5 μ g de RNasa y 1,65 U de polimerasa *Biotaq* (BioLine). La amplificación PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, EE.UU.) y las condiciones de ciclos de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 45 seg a 54 °C y 1 min a 70°C, y una extensión final de 8 min a 70°C. El iniciador 8F fue marcado con FAM (6-carboxyfluoresceína) para la posterior visualización de los fragmentos de restricción terminal (TRF). La amplificación de PCR primero fue testada por electroforesis en gel de agarosa antes de llevar a cabo la digestión.

Para los análisis FT-RFLP se utilizó la enzima de restricción *MspI* de digestión rápida (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Para ello, 5 μ l del producto de amplificación fue digerido con el enzima de restricción siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, 4 μ l del ADN digerido se diluyeron en 6 μ l de agua para el análisis de fragmentos. Los TRFs se separaron en un analizador genético 3130XL (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados utilizando el estándar de tamaño ROX-1000 y las matrices que contenían la incidencia así como la altura de los picos de los datos individuales de TRFs se generaron con el paquete estadístico Genemapper version 3.7 (Applied Biosystems). Los picos menores de 50 bp no fueron incluidos en el análisis para eliminar los dímeros de iniciadores y otras pequeñas moléculas presentes en los perfiles, así como aquellos TRFs que no estuvieron presentes en al menos dos de las tres repeticiones analizadas. La abundancia relativa de cada TRF se calculó como la proporción de la fluorescencia (área del pico) de un

TRF específico en una muestra respecto de la fluorescencia total de la muestra.

IV.3.6. Análisis de datos

Los datos de población fueron convertidos a log UFC/g de peso fresco de la raíz para cumplir con los supuestos del test paramétrico utilizado. Los datos fueron analizados utilizando el programa STATITIX 9.0 (Analytical Software, St. Paul, MN, EE.UU.). Las diferencias en las densidades de población entre los tratamientos se determinaron mediante análisis de varianza estándar. Se utilizó un diseño de tratamiento factorial para el análisis de experimentos en el cual el tiempo de crecimiento y genotipo de olivo o vivero de olivo fueron factores principales. Cuando existieron diferencias significativas se realizó un análisis de comparación de medias utilizando el Contraste Protegido de Fisher de las Mínimas diferencias significativas ($P=0,05$) y un análisis de tendencias basado en polinomios ortogonales para analizar el efecto del tiempo de incubación.

Para cada muestra rizosférica y repetición los perfiles TRFs fueron alineados con Genmapper y se generó un perfil consenso para cada comunidad rizosférica que consistió en el promedio de la intensidad de fluorescencia relativa estandarizada para cada fragmento. Los perfiles consensos estandarizados se analizaron con el paquete estadístico Bionumerics 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) utilizando el coeficiente de distancia Euclídea al cuadrado, que tiene en cuenta los datos continuos tanto de posición como área de pico estandarizada. El análisis de agrupamiento a partir de las distancias obtenidas de los distintos tratamientos se realizó utilizando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). El coeficiente de correlación cofenético se calculó para determinar la robustez de los agrupamientos encontrados.

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1. Densidades de población de bacterias cultivables en la rizosfera y endosfera de plantones de olivo procedentes de viveros de olivo certificados

La densidad inicial de bacterias en la rizosfera y endosfera de los diferentes plantones de olivo varió significativamente en función del vivero muestreado (REY, COT y PC) ($P < 0,017$), tanto para las poblaciones de bacterias heterotróficas totales cultivables (BCT) como para *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Ps) (Fig. IV.1). Globalmente, los plantones de olivo procedentes del vivero PC presentaron una mayor ($P < 0,05$) densidad de poblaciones de BCT y Ps en la endosfera y de Ps en la rizosfera seguidos por COT y REY que presentaron valores similares de densidades de población (Fig. IV.1). En todos los viveros, las densidades de población en la rizosfera para las BCT estuvieron comprendidas en un rango de log 7,89 a log 6,18 ufc/g de raíz, en tanto que las poblaciones de Ps fueron menores (aproximadamente entre 0,5 a 2 órdenes de magnitud) estando comprendidas en un rango de log 6,64 a log 4,59 ufc/g de raíz en los tres viveros. Una proporción similar fue encontrada también para las poblaciones de BCT y Ps en la endosfera, aunque éstas fueron de 1 a 2,5 órdenes de magnitud inferiores a las obtenidas en la rizosfera (Fig. IV.1).

Por otro lado, también existieron diferencias significativas ($P < 0,021$) en las densidades de población de BCT y Ps entre los cultivares estudiados tanto en la rizosfera como en la endosfera, aunque los niveles de población y diferencias detectadas en los diferentes genotipos no se mantuvieron en todos los viveros y dependieron de la procedencia de los plantones (Fig. IV.1). Así, Arbequino y Frantoio procedentes del vivero PC presentaron los mayores niveles ($P < 0,05$) de población para BCT y Ps en la endosfera y de Ps en la rizosfera, mientras que Hojiblanca y Picudo procedentes del vivero REY presentaron los menores niveles de BCT y Ps

en la rizosfera, y Picual procedente de COT los menores niveles de Ps y BCT en la endosfera (Fig IV.1).

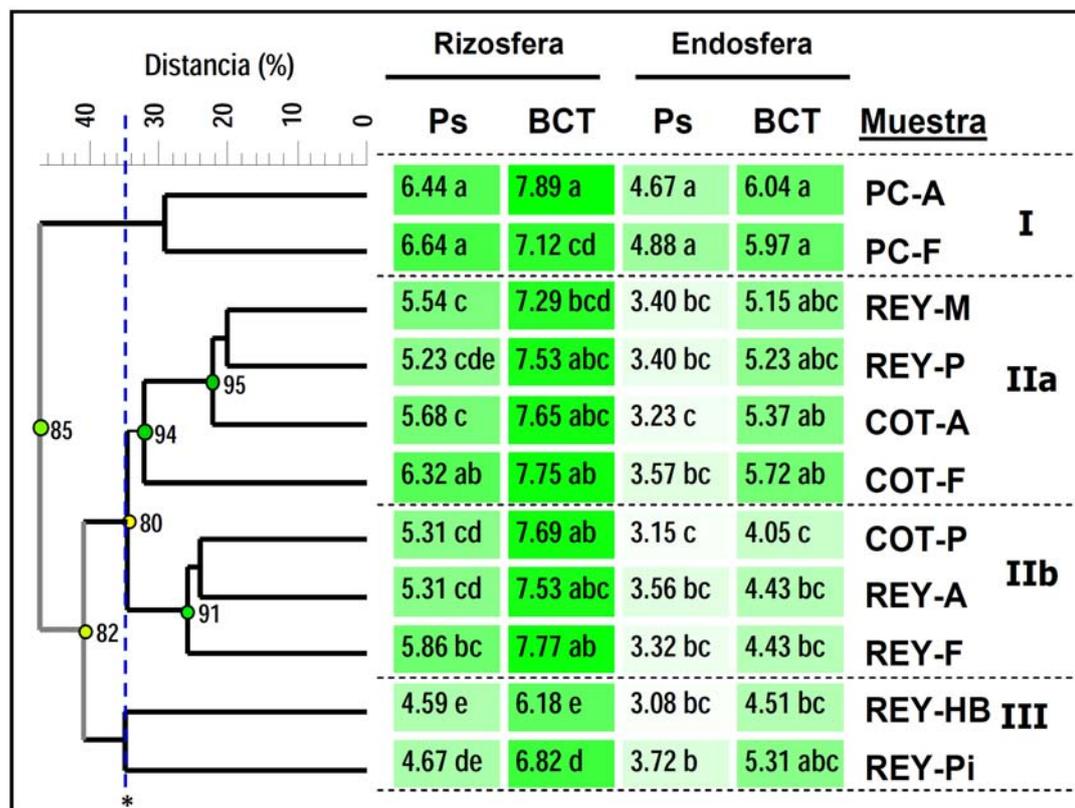


Figura. IV.1. Análisis de agregación de bacterias heterotróficas cultivables totales y *Pseudomonas* sp. fluorescentes en la rizosfera y endosfera de 11 muestras de patrones de olivo de diferentes viveros. Los datos de seis muestras de raíz independientes se combinaron previamente al análisis de cada combinación vivero-cultivar de olivo. El método no ponderado par-grupo usando promedios aritméticos (UPGMA) fue aplicado para generar la matriz de similitud generada de los datos de densidad de población [Log unidades formadoras de colonias (ufc/g) de raíz] utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. Los valores de correlación cofenética son indicados en cada nodo. (*)= Los grupos y subgrupos fueron definidos en base a un valor de corte de 34,79% y 40,75%, respectivamente. La intensidad del color verde es proporcional a los valores de densidad de población.

Para analizar de forma global el efecto del cultivar de olivo y su interacción con su procedencia de cada vivero se realizó un análisis de agregación (UPGMA) con los valores de densidad de población obtenidos para BCT y Ps tanto en la rizosfera como endosfera. El análisis de agregación identificó tres grupos principales (I, II y III) con dos subgrupos (IIa y IIb) en base a un valor límite del coeficiente de distancia Euclídea del 40,75 ó de 34,79%, respectivamente (Fig. IV.1). En el grupo I se incluyen los cultivares Arbequina y Frantoio procedentes del vivero PC que

presentan los valores más altos de densidad de población de BCT y Ps tanto en la rizosfera como endosfera. En el grupo III se incluyen los cultivares Picual y Hojiblanca procedentes del vivero REY que presentan los menores niveles de densidad de población de BCT y Ps en la rizosfera, valores de densidad de población en la endosfera medios para Ps y medios-altos para BCT. Finalmente, en los grupos IIa y IIb se incluyen el resto de cultivares procedentes de los viveros COT y REY con valores de densidad de población medios-altos de BCT y Ps en la rizosfera y medios-bajos de Ps en la endosfera. Los subgrupos IIa y IIb se diferencian en base a niveles de población de BCT en la endosfera altos en el primero (IIa) y bajos en el segundo (IIb) (Fig. IV.1).

IV.4.2. Dinámica de las densidades de población de bacterias cultivables en la rizosfera y endosfera de olivo durante el tiempo de crecimiento

En la Tabla IV.1 se presentan los valores medios de colonización obtenidos en la rizosfera y endosfera de BCT y PS. Las densidades de población de BCT y PS en la rizosfera y endosfera varió significativamente ($P < 0,001$) durante el tiempo de crecimiento, el cultivar de origen y sus interacciones. Las densidades de población de BCT en la rizosfera, tras 12 o 18 meses de crecimiento, estuvieron comprendidas en un rango entre log 6,98 a log 7,81 ufc/g de raíz en todos los cultivares evaluados mientras que las poblaciones de Ps fueron menores (aproximadamente de dos órdenes de magnitud) y estuvieron comprendidas entre log 5,31 a log 6,86 ufc/g de raíz (Tabla IV.1). Por otro lado, las poblaciones en la endosfera fueron al menos dos órdenes de magnitud menores que en la rizosfera tanto para las BCT como las Ps, estando las densidades de población de BCT comprendidas entre log 3,08 a log 6,02 ufc/g de raíz, mientras que las de Ps estuvieron comprendidas en un rango de log 3.08 a log 4.89 ufc/g de raíz (Tabla IV.1). Es de destacar los niveles de población de bacterias

endofitas (tanto BCT como Ps) en el caso del cv. Manzanillo que resultaron excepcionalmente altos.

En la Tabla IV.1 se presenta el análisis de tendencias de los niveles de densidad de población en función del tiempo de crecimiento tras el trasplante (tiempo 0) a un suelo natural de los seis cultivares de plántones de olivo estudiados. Este análisis indicó que las poblaciones de BCT en la rizosfera se mantuvieron constantes en el tiempo, a excepción del cv. Hojiblanca en el que existió una tendencia lineal significativa creciente. En el caso de las Ps en la rizosfera en todos los casos (excepto el cv. Arbequina en el que no existieron diferencias significativas) existió un incremento de las densidades de población en el tiempo con una tendencia lineal significativa ($P < 0.05$), que explicó entre el 71,4 al 99,5 % de la variación de la colonización rizosférica y que en el caso del cv. Frantoio resultó ser cuadrática explicando esta tendencia más del 57% de la variación (Fig. IV.2; Tabla IV.1).

Para todos los casos, las poblaciones bacterianas de la endosfera mostraron un incremento significativo de las densidades de población, excepto en el caso del cv. Picudo para BCT y Ps y el cultivar Picual para BCT. La tendencia lineal fue la que explicó en todos los casos (excepto el cv. Frantoio para las BCT) en mayor proporción (58,7 a 93,7%) la evolución de las densidades de población en el tiempo (Fig. IV.2; Tabla IV.1).

Para las BCT y Ps en la rizosfera, existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los niveles de densidad de población inicial entre cultivares, siendo el cv. Frantoio el que albergó densidades de población significativamente mayores ($P=0,05$) de BCT (log 7,77 ufc/g raíz) y de Ps (log 5.86 ufc/g raíz) de hasta un orden de magnitud con respecto a los cultivares Hojiblanca y Picudo. Sin embargo, a los 12 meses del trasplante no existieron diferencias significativas entre cultivares en los niveles de densidad de población de BCT y Ps en la rizosfera, que si se vuelven a detectar a los 18 meses de crecimiento tras el trasplante (Tabla IV.1). Transcurrido este tiempo, los cvs. Frantoio y Hojiblanca presentaron densidades de población en la rizosfera significativamente mayores

($P=0,05$) (de hasta un orden de magnitud) tanto de BCT como de Ps a los de los cv. Picudo y Arbequina (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Efecto del tiempo de incubación tras el trasplante sobre las densidades de población de bacterias heterotróficas cultivables totales (BCT) y *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Ps) presentes en la rizosfera y endosfera en diferentes cultivares de olivo

Población	Cultivar	Tiempo de incubación ^(a) (log ufc/g de raíz)			Fuente de Variación ^(b)	SCT (%) ^(c)	
		0	12	18			
BCT-Rizosfera	Picual	7,53 ab	7,06	7,46 ab	NS		
	Arbequina	7,53 ab	7,30	7,10 bc	NS		
	Hojiblanca	6,18 c	6,98	7,64 a	Lineal	99,7	
	Frantoio	7,77 a	7,38	7,81 a	NS		
	Manzanillo	7,29 ab	7,30	7,52 ab	NS		
	Picudo	6,82 bc	7,06	6,98 c	NS		
Ps-Rizosfera	Picual	5,23 ab	5,62	6,80 a	Lineal	93,1	
	Arbequina	5,31 ab	5,46	5,37 b	NS		
	Hojiblanca	4,59 b	5,70	6,56 a	Lineal	99,5	
	Frantoio		5,86 a	5,31	6,86 a	Lineal	42,3
						Cuadrática	57,7
	Manzanillo		5,54 a	5,47	6,62 a	Lineal	71,4
Cuadrática							
Picudo		4,67 b	5,31	5,55 b	Lineal	94,3	
BCT-Endosfera	Picual	5,23	5,15 b	5,55	NS		
	Arbequina	4,43	5,70 ab	5,67	Lineal	74,5	
					Cuadrática	25,5	
	Hojiblanca	4,51	5,86 ab	5,97	Lineal	81,7	
					Cuadrática	18,3	
	Frantoio	4,43	3,08 c	5,25	Lineal	15,1	
Cuadrática					84,9		
Manzanillo		5,15	5,94 a	6,02	Lineal	83,3	
Picudo		5,31	5,62 ab	5,97	NS		
Ps-Endosfera	Picual	3,40	3,64 bc	4,36	Lineal	92,9	
	Arbequina	3,56	4,51 a	4,47	Lineal	73,9	
	Hojiblanca	3,08	4,27 ab	4,59	Lineal	90,9	
	Frantoio	3,32	3,08 c	4,24	Lineal	58,7	
					Cuadrática	41,3	
	Manzanillo		3,40	3,79 b	4,89	Lineal	93,7
Picudo		3,72	3,87 ab	4,30	NS		

^(a) Tiempo de crecimiento tras el trasplante (meses). Valores en una columna para cada grupo bacteriano seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al contraste protegido de Fisher de las mínimas diferencias significativas ($P=0,05$).

^(b) El análisis de tendencia de los valores se realizó para los modelos lineal y cuadrático. Solo se indican aquellos modelos que resultaron significativos ($P<0,05$)

^(c) SCT (%) = Porcentaje de la suma de cuadrados total que explica cada tendencia

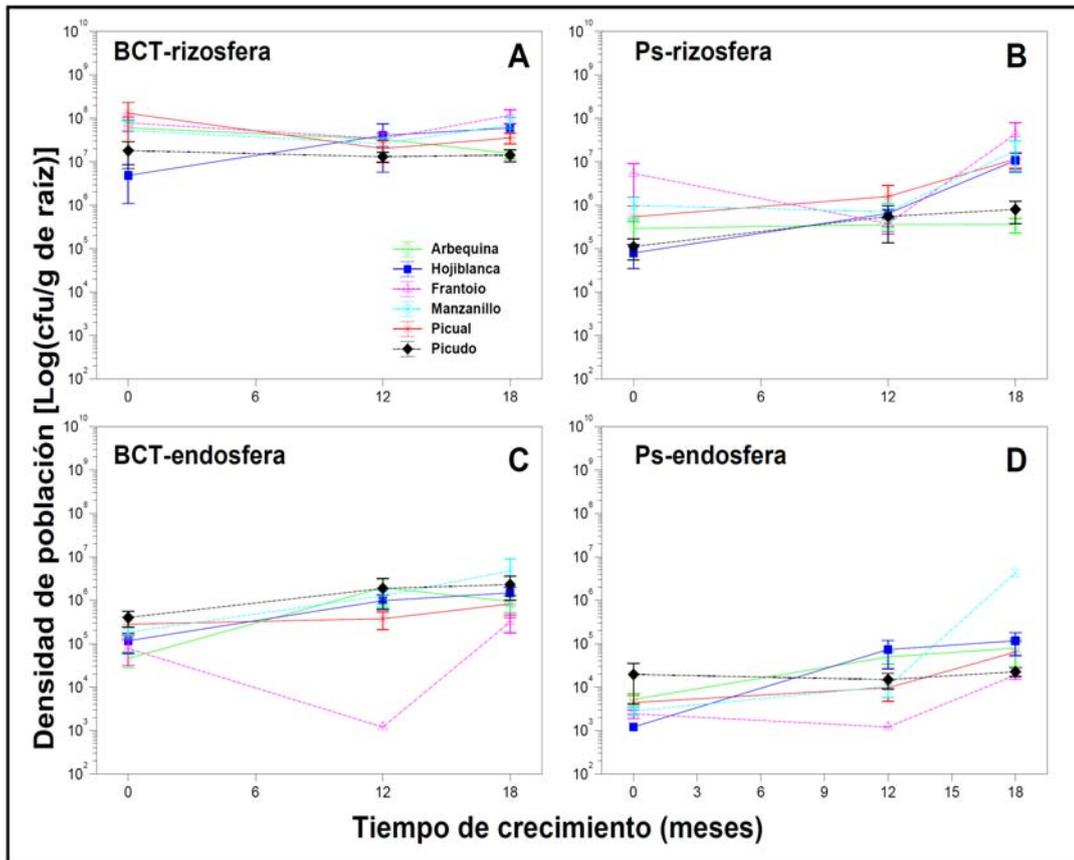


Figura IV.2. Dinámica de poblaciones de bacterias heterotróficas cultivables totales (BCT) (A y C) y *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Ps) (B y D) en la rizosfera (A y B) y endosfera (C y D) de 6 cultivares de plántones de olivo tras 12 y 18 meses después del trasplante a un suelo natural y crecimiento en condiciones naturales. Los valores corresponden a la media de seis plantas independientes \pm error estándar

En el caso de las bacterias endofitas (BCT y Ps), sólo se detectaron diferencias significativas entre cultivares a los 12 meses tras el trasplante, siendo el cv. Frantoio el que presentó densidades de población significativamente ($P=0,05$) menores respecto del resto de cultivares estudiados (Tabla IV.1).

IV.4.3. Diversidad y estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera de plántones de olivo procedentes de viveros de olivo certificados

El análisis FT-RFLP permitió identificar hasta 113 perfiles de restricción terminales (TRFs) distintos entre las 11 combinaciones diferentes

cultivares de olivo-vivero de procedencia. El análisis de agregación (UPGMA) generado mediante la combinación de los distintos TRFs de las comunidades bacterianas de la rizosfera de olivo provenientes de 3 viveros diferentes, diferenciaron a los cultivares de olivo de acuerdo al vivero de procedencia (COT, PC Y REY) (Fig. IV.3). Así el análisis de agregación identificó dos grupos principales (I y II) y dos subgrupos (Ia y Ib) en base a un valor límite del coeficiente de distancia Euclídea del 20,21 ó 17,76%, respectivamente (Fig. IV.3). Los viveros COT y PC se incluyeron en el grupo principal I, dividido a su vez en dos subgrupos en los que se diferenciaban ambos viveros. En el subgrupo Ia se incluyeron las plantas del vivero COT, en donde los cultivares Arbequina y Frantoio presentaron mayor similitud en la estructura de las comunidades bacterianas totales entre ellos, y unos mayores valores de los índices de 'Riqueza' en número de TRFs y del índice Shannon respecto al cv. Picual (Fig. IV.3). Por otro lado en el subgrupo Ib se incluyeron los dos cultivares procedentes del vivero PC, en el que los cvs. Arbequina y Frantoio presentaron mayor similitud entre ellos que en el caso del vivero COT. Finalmente todos los cultivares procedentes del vivero REY se incluyeron en el grupo II, que se caracterizó por tener valores más altos de 'Riqueza' en número de TRFs y del índice Shannon en todos sus cultivares que todos los cultivares presentes en los grupos I procedentes de los viveros PC y COT. Además, en este grupo los cultivares Arbequina, Frantoio y Picual tienen mayor similitud entre ellos en la estructura de las comunidades bacterianas comparados con los cultivares Manzanillo, Picudo y Hojiblanca que se incluyen en un grupo independiente. Entre estos últimos, destaca el cultivar Hojiblanca como el cultivar con mayor diversidad reflejado en los mayores valores de número de TRFs encontrados y del índice Shannon de diversidad (Fig. IV.3).

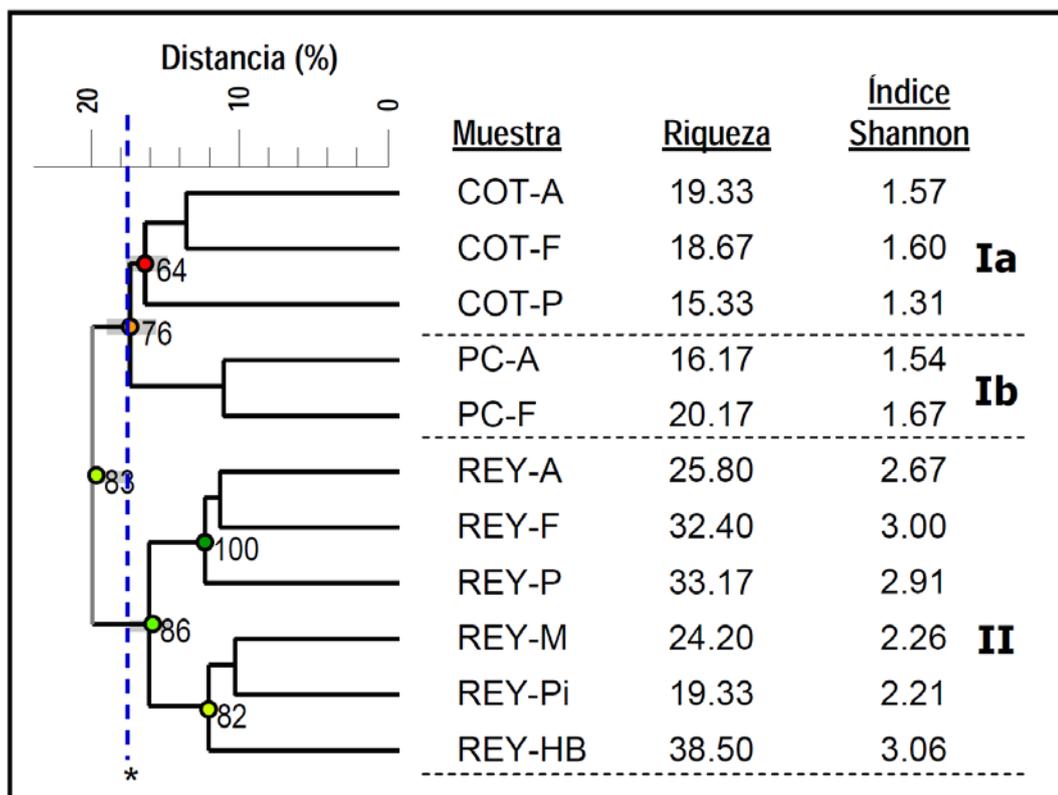


Figura IV.3 Análisis de agregación de los perfiles de fragmentos de restricción terminal fluorescentes de las poblaciones bacterianas de la rizosfera de 11 muestras de patrones de olivo generados por la enzima *MspI*. Seis amplificaciones independientes se combinaron previamente al análisis para cada combinación vivero-olivo. El método no ponderado par-grupo usando promedios aritméticos (UPGMA) fue aplicado para generar la matriz de similitud de la abundancia relativa de cada fragmento de restricción terminal (TRFs) utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. La riqueza (Número de TRFs) e índice de Diversidad de Shannon-Weiner fueron incluidos también para cada muestra. Los valores de correlación cofenética están indicados en cada nodo. (*)= Los grupos y subgrupos fueron definidos en base a un valor de corte de 20,21% y 17,76% respectivamente.

IV.4.4. Cambios en la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera de plantones de olivo durante el tiempo de crecimiento

El análisis FT-RFLP permitió identificar hasta 135 TRFs distintos entre las 18 combinaciones diferentes cultivares de olivo-vivero de procedencia. En el momento del transplante (T0) se identificaron hasta 104 TRFs, mientras que a los 12 (T1) y 18 (T2) meses tras el trasplante se identificaron 91 y 105 TRFs, respectivamente. Además a los 12 y 18 meses tras el trasplante se identificaron 30 TRFs nuevos que no estaban

presentes en el T0, mientras que existieron 17 TRFs que se detectaron exclusivamente antes del trasplante.

El análisis de agregación (UPGMA) generado mediante la combinación de los distintos TRFs de las comunidades bacterianas de la rizosfera de olivo provenientes de seis cultivares distintos muestreadas en distintos tiempos de crecimiento diferenciaron a los distintos tratamientos, en primer lugar, en función del tiempo de muestreo y en segundo lugar, en función del genotipo de olivo (Fig. IV.4). Así el análisis de agregación identificó tres grupos principales (I, II y III) y dos subgrupos (Ia y Ib, y IIa y IIb) en base a un valor límite del coeficiente de distancia Euclídea del 79,03 ó 58,29%, respectivamente (Fig. IV.4). El análisis de la estructura de las poblaciones bacterianas totales en la rizosfera indicó que en el primer momento de muestreo (T0), cuando los plantones había crecido en el sustrato proporcionado por los viveristas, e inmediatamente antes del trasplante los seis genotipos de olivo se incluyeron en el mismo grupo I, identificándose dos subgrupos Ia y Ib similares a los identificados en la Fig. IV.3. La estructura de las poblaciones bacterianas totales fue más similar entre los cvs. Manzanillo, Picudo y Hojiblanca (subgrupo Ib) que entre los cvs. Arbequino, Frantoio y Picual (subgrupo Ia), existiendo mayores valores de 'Riqueza' de número de TRFs y del índice Shannon en el subgrupo Ia respecto al Ib. El grupo II estuvo formado por todos los cultivares muestreados a los 12 meses después del trasplante (T1) y por los cvs. Hojiblanca, Manzanillo, Picudo y Frantoio muestreados a los 18 meses tras el trasplante (T2). En este grupo, el subgrupo IIa se caracterizó por valores similares del número de TRFs y del índice Shannon. Es de destacar que en el Grupo II los cvs. Arbequino y Frantoio muestreados en el T1 se diferenciaron de forma independiente (subgrupo IIb) al resto. Este hecho se mantuvo de forma aún más evidente a los 18 meses de crecimiento en el campo (T2), ya que ambos cvs. se incluyeron en el grupo III, de forma independiente al resto, existiendo una distancia de similitud entre ellos mayor a la existente en el resto de tratamientos y prácticamente similar a la que presentaban en el momento del trasplante (Fig. IV.4).

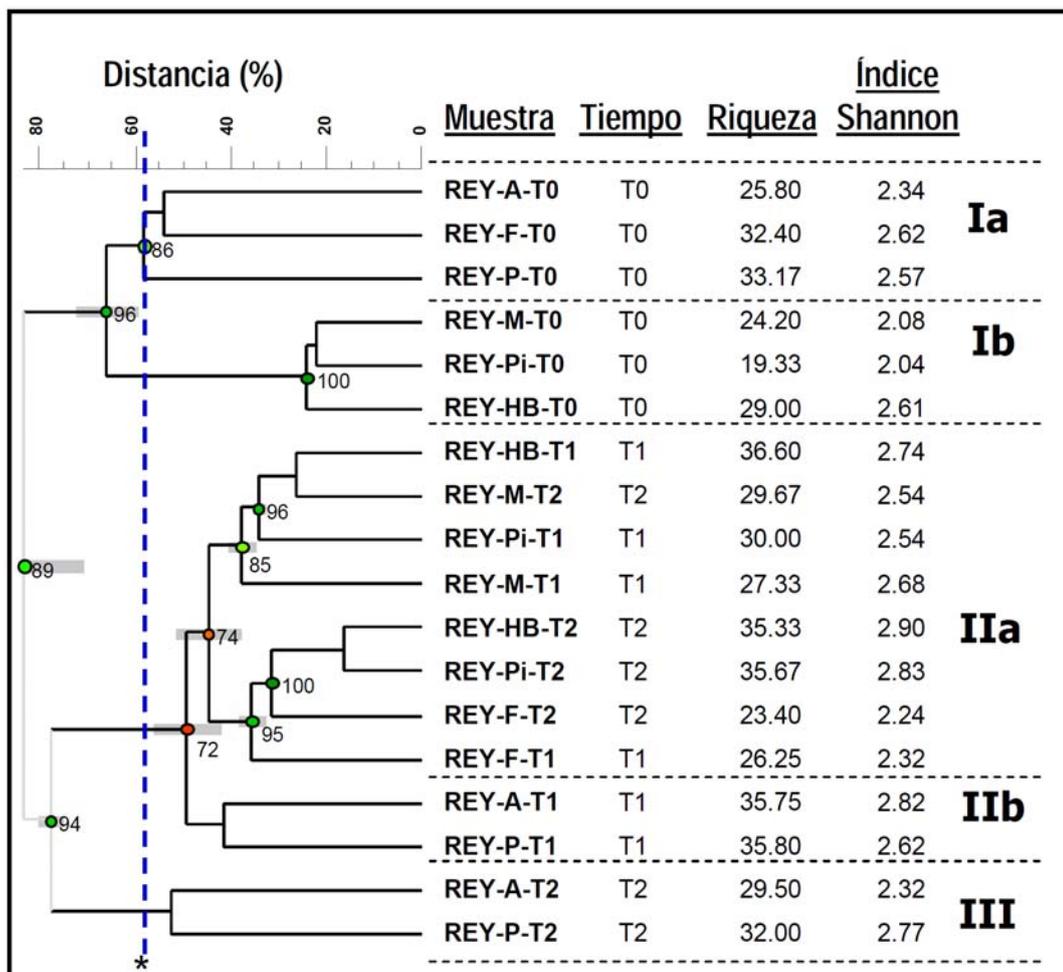


Fig. IV.4. Análisis de agregación de los perfiles de TRFs de las poblaciones bacterianas de la rizosfera de 5 muestras de patrones de cultivares de olivo generados por la enzima *MspI*. Seis amplificaciones independientes se combinaron previamente al análisis para cada combinación tiempo de incubación-olivo. El método no ponderado par-grupo usando promedios aritméticos (UPGMA) fue aplicado para generar la matriz de similitud de la abundancia relativa de cada TRFs utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. La riqueza (Número de TRFs) e índice de Diversidad de Shannon-Weiner fueron incluidos también para cada muestra. Los valores de correlación cofenética están indicados en cada nodo. (*)= Los grupos y subgrupos fueron definidos en base a un valor de corte de 79,03% y 58,29% respectivamente.

IV.5. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios concernientes a las comunidades bacterianas de la rizosfera y la endosfera se han enfocado principalmente en especies de plantas agrícolas y hortícolas; y existen pocos trabajos enfocados a plantas leñosas (i.e., Araujo *et al.*, 2002; Bent y Chanway, 2002; Cambours *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2005). Sin

embargo, hasta donde sabemos, ninguna investigación se ha centrado en el estudio de la composición de las comunidades bacterianas en la rizosfera y endosfera de plantones de olivo.

En este estudio, se utilizó un enfoque de cultivo-dependiente y cultivo-independiente para investigar el efecto de la fuente de material vegetal y el efecto del genotipo de los plantones de olivo sobre la estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera y la endosfera y su variación temporal después del trasplante a un suelo natural y crecimiento bajo condiciones de campo. Nuestros resultados indican que el origen (vivero) de los plantones de olivo y el genotipo de la planta fueron los factores que influenciaron de forma principal la estructura de las comunidades bacterianas totales así como la densidad de población tanto de las bacterias cultivables totales (BCT) como de *Pseudomonas* fluorescentes (Ps), y este efecto se encontró tanto en la rizosfera como en la endosfera.

El análisis FT-RFLP de las comunidades bacterianas totales de los diferentes genotipos reveló diferencias significativas en la estructura de las comunidades bacterianas principalmente en función del vivero de origen y, en segundo lugar en función del genotipo de olivo, indicando que cada cultivar de olivo alberga poblaciones bacterianas específicas. De este modo, las poblaciones totales de la rizosfera de los diferentes plantones de olivo fueron marcadamente diferentes entre viveros para el mismo genotipo de olivo y también entre los diferentes cultivares de olivo para el mismo vivero. De igual forma, la densidad de población de las BCT y Ps en la rizosfera y endosfera difirieron significativamente de acuerdo al origen de los viveros y al genotipo (cultivar) del olivo aunque el efecto neto de cada uno de estos factores fue similar.

En Andalucía, la producción de plántulas de olivo está basada en un sistema de propagación en túneles de nebulización utilizando estaquillas semileñosas (Caballero y del Río, 1999). Todos los viveros evaluados en este estudio siguen el mismo procedimiento para la producción de plantones de olivo. Por esta razón, durante la propagación factores

intrínsecos como el genotipo del clon de la planta madre de olivo certificada utilizada para obtener las estaquillas o la naturaleza y origen del sustrato (mezcla de suelo y turba) utilizados para el enraizado de las plantas, son factores fundamentales que tendrán indudablemente una influencia sobre la estructura inicial y abundancia de las comunidades bacterianas de la rizosfera que se establezcan durante el enraizado de las plántulas en los diferentes viveros. Todos estos factores podrían explicar las diferencias encontradas entre las plantas de olivo de los diferentes viveros pero no las diferencias encontradas entre cultivares de olivo procedentes del mismo vivero. Dado que todos los plantones de los cultivares de olivo de un mismo vivero se muestrearon al mismo tiempo, edad y pertenecían al mismo lote de producción (i.e., fueron producidos durante la misma semana utilizando el mismo sustrato), las diferencias significativas en la estructura de la población bacteriana en la rizosfera entre los genotipos de olivo se puede atribuir a un efecto del cultivar.

Utilizando diversas técnicas de caracterización molecular, otros autores han encontrado un marcado efecto del genotipo de la planta huésped en la estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera y la endosfera tanto en plántulas como en plantas adultas de árboles pertenecientes a diferentes especies (Araujo *et al.*, 2002; Cambours *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006; Ulrich *et al.*, 2008). De este modo, las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera parecen ser dependientes del genotipo de plantas de gran longevidad, sugiriendo que cada especie de árbol, cultivar o clon dentro de una especie tiene una estrecha asociación con bacterias específicas. Además, parece que la estructura de las poblaciones bacterianas de la rizosfera de los árboles puede ser correlacionada con el pedigrí (fondo genético) de los diferentes clones, ya que se ha encontrado una mayor diversidad de bacterias en los híbridos en comparación con el material parental de algunas especies como el álamo (Ulrich *et al.*, 2008). Es de destacar el estudio de Belaj *et al.* (2003) en el que se analizó la diversidad genética y relaciones existentes entre 32 cultivares de olivo cultivados en Italia y España combinando el uso

de marcadores de ADN incluyendo RAPDs (Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN), AFLPs (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) y SSRs (Repetición de Secuencias Simples). Sus resultados mostraron que los cultivares de olivo Arbequina y Frantoio se agrupan de forma conjunta e independientes del resto de los cultivares utilizados en este estudio (Hojiblanca, Manzanilla, Picudo y Picual) mostrando una relación genética estrecha entre ellos. En nuestro estudio, Arbequina y Frantoio también mostraron una mayor similitud en la estructura de sus comunidades bacterianas en la rizosfera iniciada desde la etapa de propagación en vivero hasta 18 meses después del trasplante creciendo en el suelo natural bajo condiciones de campo. Esto podría apoyar la hipótesis de que existe una fuerte interacción entre el fondo genético de la planta huésped y el proceso de colonización bacteriana en la rizosfera (Landa *et al.*, 2006) ya que todas las plantas de olivo en nuestro estudio fueron cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales, tipo de suelo y manejo después del trasplante.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la diferente estructura y diversidad de las poblaciones bacterianas encontradas en los seis cultivares de olivo pueden ser probablemente el resultado de diferencias en la arquitectura de la raíz o en la cantidad y composición de exudados radicales de los diferentes genotipos de olivo, los cuales permitirían seleccionar comunidades bacterianas específicas del sustrato de crecimiento como resultado de los perfiles de exudados únicos de cada genotipo. Además, las diferencias en la densidad de población de BCT y Ps fluorescentes podría indicar que hay una capacidad diferencial de cada genotipo de olivo para seleccionar y mantener un cierto número de bacterias en cada medio ambiente específico rizosférico como se ha demostrado en otros cultivos (de la Fuente *et al.*, 2006; Landa *et al.*, 2002, 2006).

Es reconocido que los exudados de las raíces difieren de acuerdo a la especie de planta, incluso cultivares o genotipos de la misma especie (existen diferencias en la cantidad y composición de los exudados de las

raíces como fuente de energía), afectando el número y diversidad de algunos microorganismos, y también que los diferentes microorganismos responden de una manera diferente a los compuestos liberados por las raíces (Griffiths *et al.*, 2001; Kozdrój y van Elsas, 2000; Wang *et al.*, 2009). En este contexto, diversos trabajos han mostrado evidencias sólidas que demuestran que diferentes genotipos de plantas de una misma especie huésped difieren en la composición de las comunidades microbianas en la rizosfera (Biedrzycki y Bais, 2009; Gu y Mazzola, 2003; Marilley y Aragno, 1999; Marschner *et al.*, 2006; Micallef *et al.*, 2009).

Indudablemente, el suelo también es un factor importante en la interacción específica genotipo de la planta-poblaciones bacterianas de la rizosfera, ya que las características químicas de éste influyen directamente a los microorganismos de la rizosfera o indirectamente mediante la modificación por el crecimiento de las raíces y sus exudados (Rengel y Marschner, 2005). Asimismo, las comunidades microbianas del suelo varían ampliamente en el espacio y tiempo en esta interacción (Lynch, 2004). En este estudio, evaluamos la variabilidad temporal de las comunidades bacterianas en la rizosfera y endosfera de seis genotipos de olivo a 12 y 18 meses después del trasplante. Nuestros resultados mostraron que 12 meses después del trasplante en un suelo natural, las grandes diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera que encontramos entre los cultivares en la etapa de vivero se siguieron manteniendo aunque de forma atenuada, no obstante la estructura de las comunidades bacterianas en la rizosfera establecida tras el transplante difirió ampliamente de las iniciales. En contraste, después de 18 meses de crecimiento y coincidiendo con un crecimiento vegetativo activo de las plantas, las diferencias entre cultivares de olivo fueron de nuevo mucho más evidentes. Las variaciones de las condiciones medioambientales durante el crecimiento del olivo podrían explicar las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas ya que el medio ambiente puede afectar el crecimiento bacteriano directamente, y a su vez indirectamente a través de los cambios producidos en la fisiología

de la planta (calidad y cantidad de exudados de las raíces, desarrollo de la raíz, crecimiento de la planta etc.) (Baudoin *et al.*, 2002; Di Cello *et al.*, 1997; Duineveld *et al.*, 2001; Garveba *et al.*, 2004; Marschner *et al.*, 2002; Yang y Crowley, 2000).

Otros estudios han encontrado cambios en las poblaciones bacterianas en la rizosfera de árboles leñosos en función del tiempo de muestreo. Así, Benizri *et al.* (2005) encontraron un efecto significativo del tiempo de muestreo en las comunidades bacterianas cultivables en la rizosfera de *Prunus* sp., mostrando que estas comunidades bacterianas presentaban un perfil distintivo en la utilización de las fuentes de carbono en función del tiempo de muestreo lo que revela cambios en la estructura de las comunidades en el tiempo. Además, Rumberger *et al.* (2007) encontraron diferencias en la composición de las comunidades microbianas cultivables de la rizosfera de patrones de manzano, sin embargo las diferencias atribuibles al genotipo huésped fueron pequeñas en comparación con los atribuibles a los efectos estacionales y anuales.

Dentro de las BCT en el presente trabajo nos centramos en determinar el efecto del genotipo de olivo en las densidades de población de las *Pseudomonas* fluorescentes más abundantes. Las *Pseudomonas* fluorescentes son bacterias cosmopolitas habitantes comunes de la rizosfera y son consideradas uno de los grupos más estudiados de bacterias con potencial antagonista frente a patógenos de plantas. En los últimos años, las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes han sido ampliamente estudiadas como potenciales agentes de biocontrol debido a sus amplios mecanismos de control biológico y a la capacidad y eficiencia de muchas de las cepas para producir uno o más antibióticos como los derivados de fenazinas, pioluteorina, pirrolnitrina, oomicina A, viscosinamida y 2,4-diacetilfluoroglucinol entre otros (Höfte y Altier, 2010; Raudales *et al.*, 2009; Weller *et al.*, 2007). Nuestros resultados mostraron que la densidad de población de *Pseudomonas* fluorescentes fueron altos tanto en la rizosfera como endosfera de los diferentes cultivares de olivo y que estas densidades de población estuvieron influenciadas principalmente

por el origen (vivero), difirieron significativamente con el genotipo de olivo y en menor medida con el tiempo de crecimiento en un suelo natural. Así, la densidad de población de *Pseudomonas* fluorescentes se mantuvo casi al mismo nivel o se incrementó durante un año y medio de crecimiento en comparación con las densidades de población estimadas en el momento del trasplante. Otros autores han encontrado que la densidad de *Pseudomonas* autóctonas en árboles, difieren de acuerdo al clon o genotipo del mismo (Mazzola *et al.*, 2004; Rumberger *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2006) y tienden a disminuir con los años de crecimiento (Catska *et al.*, 1982; Rumberger *et al.*, 2007). De forma interesante, las densidades de población de *Pseudomonas* autóctonas que se encontraron en la rizosfera y endosfera de plántulas de olivo fueron similares o mucho más altas que otros niveles de población citados anteriormente para *Pseudomonas* autóctonas o introducidas en plantas leñosas (i.e., Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Prieto y Mercado-Blanco, 2008; Rumberger *et al.*, 2007) y estuvieron por encima del límite del umbral el cual se ha referido para la supresión natural de patógenos del suelo (Weller *et al.*, 2007).

En general, independientemente del vivero de origen, Frantoio fue el genotipo de olivo que alberga la densidad de población más alta de *Pseudomonas* fluorescentes en la rizosfera, y niveles medios en la endosfera. En contraste, Hojiblanca y Picual son los genotipos que albergaron las poblaciones más bajas en ambos nichos de la raíz. Diferentes estudios han apoyado la fuerte influencia del genotipo de la planta en la composición y densidad de población de *Pseudomonas* fluorescentes autóctonas e inoculadas (i.e., Gu y Mazzola, 2003; Jamali *et al.*, 2009; Landa *et al.*, 2003, 2006; Mazzola y Gu 2000; Notz *et al.*, 2001; Okubara *et al.*, 2004). Además, otras investigaciones han revelado que la producción de algunos compuestos antimicrobianos por las bacterias usadas en el biocontrol es modulada por el genotipo de la planta huésped, suelo y características de la rizosfera incluyendo la concentración y el tipo de carbono, nitrógeno y la fuente de aminoácidos y otros compuestos que se encuentran abundantemente en los exudados de las raíces de las

plantas (Duffy y Défago, 1999; Milner *et al.*, 1995, 1996; Okubara y Bonsall, 2008; Slininger y Jackson, 1992).

Nuestros resultados tienen implicaciones importantes ya que la aplicación de *Pseudomonas* fluorescentes en las plantas de olivo se ha demostrado que tienen diversos efectos beneficiosos no sólo para promover la formación de raíces en microtallos (Peyvandi *et al.*, 2010), sino también como agentes de control biológico contra *Verticillium dahliae* (Mercado-Blanco 2004; Prieto y Mercado-Blanco, 2008), el agente causal de la Verticilosis del olivo. Además, en estudios previos (Ver Capítulo IV de la presente Tesis Doctoral) hemos demostrado que olivos centenarios silvestres y cultivados que crecen en diferentes áreas en Andalucía, albergan elevadas poblaciones autóctonas de *Pseudomonas* fluorescentes tanto en la rizosfera como en la endosfera, con densidades de población similares a las que se encuentran en los plantones de olivo utilizados en este estudio. Por otra parte, las *Pseudomonas* autóctonas de olivares centenarios y acebuches pertenecen a diferentes especies, y han mostrado un alto potencial antagonista frente a *V. dahliae* a través de diversos mecanismos como la actividad proteolítica, lipolítica y quitinolítica, producción de pioverdinas y el antibiótico 2,4-diacetilfluoroglucinol.

La utilización de diferentes medidas de control de enfermedades preventivas tales como el uso de cultivares resistentes o tolerantes libres del patógeno (Jiménez-Díaz *et al.*, 2010; Navas-Cortés *et al.*, 2008) en combinación con la protección del sistema radical de la infección por *V. dahliae* mediante la aplicación de agentes de biocontrol adaptadas al olivo podría mejorar el control de la Verticilosis del olivo. En consecuencia, en el futuro sería de gran valor caracterizar la diversidad genética contenida en las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes más abundantes presentes en la rizosfera de los plantones de olivo, determinar el potencial antagonista de aislados representativos frente *V. dahliae*, así como si existe una selección específica o se ejerce un soporte diferencial en ciertos genotipos de olivo para este grupo de bacterias tal como se ha demostrado para otros cultivos (i.e., Gu y Mazzola, 2003; Jamali *et al.*, 2009; Landa *et*

al., 2003, 2006; Mazzola y Gu 2000; Okubara *et al.*, 2004). Por otra parte, el hecho que Frantoio albergara una mayor densidad de población de bacterias que Picual y Hojiblanca podría tener importantes implicaciones adicionales, las cuales pensamos deberían ser estudiadas de forma prioritaria en el futuro, ya que Frantoio es considerado tolerante a la Verticilosis causada por *V. dahliae* en comparación con Picual y Hojiblanca que son altamente susceptibles al patotipo defoliante de este patógeno considerado como altamente virulento. En otros estudios se ha demostrado la existencia de diferencias en las comunidades de bacterias cultivables y *Pseudomonas* fluorescentes de la rizosfera de patrones de manzano tolerantes y susceptibles a la “enfermedad del replante” (Mazzola *et al.*, 2004; Rumberger *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2006). El cultivo del olivo en algunas zonas del Mediterráneo se realiza tradicionalmente en tierras con baja fertilidad donde la disponibilidad de agua y nutrientes pueden ser factores limitantes para la producción del cultivo (Barranco *et al.*, 1999). Por tanto, es importante destacar que una mayor densidad de poblaciones bacterianas en la rizosfera, como es el caso de *Pseudomonas* fluorescentes podría proporcionar beneficios en la absorción de nutrientes.

En conclusión, tanto los métodos de cultivo dependiente como independiente han revelado un efecto específico del genotipo en la abundancia y estructura de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera y endosfera de plantones de olivo lo cual podría estar conceptualmente vinculado a diferencias en los patrones de exudación (cantidad y tipos de compuestos) entre genotipos así como a diferencias en los sistemas de producción en el vivero. Dado que en el olivo, de acuerdo a nuestro conocimiento, no se conocen los componentes de los exudados de las raíces, sería necesario realizar más investigaciones para generar conocimiento sobre la función ecológica de los exudados de las raíces en la interacción olivo-comunidades bacterianas. Este conocimiento podría ofrecer posibilidades para avanzar en la lucha contra la Verticilosis del olivo a través de la selección de cultivares de olivo apropiados en relación a su comunidad bacteriana rizosférica específica que se encuentra más

adaptada a esa rizosfera en particular. Aunque los estudios en relación con las especies bacterianas más abundantes que interactúan con los diferentes genotipos de olivo merecen un estudio más profundo, esta investigación representa la primera aproximación acerca de la estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera en diferentes genotipos de plantones de olivo en Andalucía, España.

IV.6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. D. y Kloepper, J.W. 2002. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Soil* 240: 181-189.
- Ahn, T.S., Ka, J.O., Lee, G.H. y Song, H.G. 2007. Revegetation of a lakeside barren area by the application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology* 45: 171-174.
- Álvarez, S., Soriano, M.A., Landa, B.B. y Gómez, J. 2007. Soil properties in organic olive groves compared with that in natural areas in a mountainous landscape in southern Spain. *Soil Use and Management* 23: 404-416.
- Angiollilo, A.; Mencuccini, M. y Baldoni, L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 411-421.
- Appuhn, A. y Joergensen, R.G. 2006. Microbial colonisation of roots as a function of plant species. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 1040-1051.
- Araujo, W.L, Marcon, J., Maccheroni, W.Jr., van Elsas, J.D., van Vuurde, J.W.L. y Azevedo, J.L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4906–4914.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., y Rallo, L. 1999. *El cultivo del olivo*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa, Junta de Andalucía.
- Baudoni, E., Benizri, E. y Guckert, A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology* 19: 135-145.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldón, L., Porceddu, S., Barranco, D. y Satovic, Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. *Annals of Botany* 100: 449-458.
- Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L. y Trujillo I. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 736–744
- Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L. y Trujillo, I. 2002. Genetic diversity and relationship in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 638-644.

- Benizri, E., Piutti, S., Verger, S., Pages, L., Vercambre, G., Poessel, J.L. y Michelot, P. 2005. Replant diseases: Bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1738-1746.
- Bent, E. y Chanway, P.C. 2002. Potential for misidentification of a spore-forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4650-4652.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. y Smalla, K. 2005. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 250-261.
- Bergsma-Vlami M., Prins, M.E. y Raaijmakers J.M. 2005. Influence of plant species on population dynamics, genotype diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 59-69.
- Biedrzycki, M.L. y Bais, H.P. 2009. Root secretions: From genes and molecules to microbial associations. *Journal Experimental of Botany* 60: 1533-1534.
- Caballero, J. M., y del Río, C. 1999. Métodos de Multiplicación. En: *El Cultivo del Olivo*. Barranco, D., Fernández- Escobar, R. y Rallo, L. (eds.). 3ª Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, pgs. 9-15.
- Cambours, M.A., Neiad, P., Granhall, U. y Ramstedt, M. 2005. Frost-related dieback of willows. Comparison of epiphytically and endophytically isolated bacteria from different *Salix* clones, with emphasis on ice nucleation activity, pathogenic properties and seasonal variation. *Biomass and Bioenergy* 28: 15-27.
- CAP-JA, 2003. *El olivar Andaluz*. Consejería de Agricultura y Pesca (ed.). Servicio de Publicaciones y Divulgación: Sevilla, Spain.
- Catska, V., Vancura, V., Hudská, G. y Prikryl, Z. 1982. Rhizosphere micro-organisms in relation to the apple replant problem. *Plant and Soil* 69: 187-197.
- Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. 2007. Anuario de estadísticas agrarias y pesqueras. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/opencms/portal/DGPAgraria/Estadísticas/estadisticasagraria?entrada=serviciosandservicio=201>.
- Cordeiro, A. I., Sanchez-Sevilla., J.F., Alvarez-Tinaut, M.C. y Gómez-Jiménez, M.C. 2008. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum* 52: 642-647.

- Dalmastrì, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. y Tabacchioni, S. 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecology* 38: 273-284.
- De la Fuente L., Landa, B.B. y Weller D. 2006. Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 96: 751-762.
- De Long, R.L., Lewis, K.J., Simard, S.W. y Gibson, G. 2002. Fluorescent pseudomonad population sizes baited from soil under pure Birch, pure Douglas fir, and mixed forest stands and their antagonisms towards *Armillaria ostoyae in vitro*. *Canadian Journal of Forest Research* 32: 2146-2159.
- Di Cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Paffeti, D., Tabacchioni, S. y Dalmastrì, C. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4485-4493.
- Duffy, B.K. y D efago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2429-2438.
- Duineveld, B.M., Kowalchuk, G.A., Keijzer, A., van Elsas, J.D., van Veen, J.A. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 172-178.
- Filion, M. 2008. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations?. *Microbial Biotechnology* 1: 463-475.
- Garbeba, P., van Veen, J.A. y van Elsas, J.D. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 45: 302-316.
- Garbeba, P., van Veen, J.A. y van Elsas, J.D. 2004. Microbial Diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243-270.
- Germida, J.J., Steven, D., Siciliano, J., de Freitas, R. y Seib, A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26: 46-50.

- Grayston S.J., Wang, S., Campbell, C.D. y Edwards, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369-378.
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J. y Ritz, K. 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil & Ecology* 16: 49-61.
- Gu, Y-H. y Mazzola, M. 2003. Modification of fluorescent pseudomonad community and control of apple replant disease induced in a wheat cultivar-specific manner. *Applied Soil & Ecology* 24: 57-72.
- Höfte, M. y Altier, N. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agent for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology* 161: 464-471.
- Holliday, P. 1989. A dictionary of Plant Pathology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Issaoui, M., Mechri, B., Echbili, A., Dabbou, S., Yanghi, A., Belguit, H., Trigui, A. y Hammami, M. 2008. Chemometric characterization of five Tunisian varieties of *Olea europaea* L. olive fruit according to different maturation indices. *Journal of Food Lipids* 15: 277-296.
- Jamali, F., Sharifi-Tehrani, A., Lutz, M.P. y Maurhofer, M. 2009. Influence of host plant genotype, presence of a pathogen, and coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* strains on the rhizosphere expression of hydrogen cyanide and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in *P. fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Microbial Ecology* 57: 267-275.
- Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Jiménez-Gasco, M.M., Landa, B.B. y Navas-Cortés, J.A. 2010. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in Andalusia and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology*. En prensa.
- Jung, S., Park, S., Kim, D. y Kim, B.S. 2008. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial community profiles in the rhizosphere of *cry1AC*-carrying *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. *The Journal of Microbiology* 46: 12-15.
- Kowalchuk, A.G., Buma, D.S., de Boer, W., Klinkhamer, P.G.L. y Van Veen, J.A. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 509-520.

- Kozdrój, J., van Elsas, J.D. 2000. Response of bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1405-1417.
- Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder, K.L., Allende-Molar, R. y Weller D.M. 2006. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 351-368.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.M., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2003. Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 93: 982-994.
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2002. Differential ability of genotypes of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3226-3237.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J. y Alabouvette, C. 1995. Effect of two plant species flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 37-42.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F. y Di Giusto, F. 2004. Allozyme variation of oleaster populations wild olive tree *Olea europaea* L. in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92: 343-351.
- Lynch, J.M., Benedetti, A., Insam, H., Nuti, M.P., Smalla, K., Torsvik, V. y Nannipieri, P. 2004. Microbial diversity in soil: Ecological theories, the contribution of molecular technique and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology & Fertility of Soils* 40: 363-385.
- Marilley, L. y Arango, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perene* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology* 13: 127-136.
- Marschner, P. y Timonen, S. 2005. Interaction between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology* 28: 23-36.
- Marschner, P., Crowley, D. y Yang, C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261: 199-208.

- Marschner, P., Neumann, G., Jania, A., Weiskopf, L. y Lieberei, R. 2002. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* 246: 167-174.
- Marschner, P., Solaiman, Z. y Rengel, Z. 2006. Rhizosphere properties of *Poaceae* genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* 283: 11-24.
- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R. y Crowley, D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1437-1445.
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R. y Crowley, D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1437-1445.
- Mazzola, M. y Gu, Y. 2000. Impact of wheat cultivation on microbial communities from replant soils and apple growth in greenhouse trials. *Phytopathology* 90: 114-119.
- Mazzola, M. y Gu, Y.H. 2002. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-5 and AG-8. *Phytopathology* 92: 1300-1307.
- Mazzola, M., Funell, D.L. y Raaijmakers, J.M. 2004. Wheat cultivar-specific of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonas species from resident soil populations. *Microbial Ecology* 48: 338-348.
- Mendes, R., Aline, A., Pizzirani-Kleiner, A.A., Araújo, W.I. y Raaijmakers, J.M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7259-7267.
- Merbach, W., Mirus, E., Knof, G., Remus, R., Ruppel, S., Russow, R., Gransee, A. y Schulze, J. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162: 373-383.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A. y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control* 30: 474-486.
- Meredith, L.B. y Bais, H.P. 2009. Root secretions: From genes and molecules to microbial associations. *Journal of Experimental Botany* 6: 1533-1534.
- Micallef, A.S., Shiaris, M.P. y Colón-Carmona, A. 2009. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany* 6: 1729-1742.

- Miller, H.J., Henken, G. y van Veen, J.A. 1989. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 656-660.
- Milner, J.L, Raffel, S.J., Lethbridge, B.J. y Handelsman, J. 1995. Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 685-691.
- Milner, J.L., Silo-Suh, L., Lee, J.C., He, H., Clardy, J. y Handelsman, J. 1996. production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3061-3065.
- Moore, P.F., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Van der Lelie, D., Campbell, C.D. y Moore, E.R.B. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 539–556.
- Navas-Cortés, J.A., Landa, B.B., Mercado-Blanco, J., Trapero-Casas, J.L., Rodríguez-Jurado, D. y Jiménez-Díaz, R.M. 2008. Spatiotemporal analysis of spreads of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology* 98: 167-180.
- Notz, R., Maurhofer, M., Schinder-Keel, U., Duffy, B., Hass, D. y Défago, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* 91: 873-881.
- Okubara, P.A. y Bonsall, R.F. 2008. Accumulation of *Pseudomonas* derived 2,4-diacetylphloroglucinol on wheat seedling roots is influenced by host cultivar. *Biological Control* 46: 322-331.
- Okubara, P.A., Komely, J.P. y Landa, B.B. 2004. Rhizosphere colonization of hexaploid wheat by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 and Q2-87 is cultivar-variable and associated with changes in gross root morphology. *Biological Control* 30: 329-403.
- Park, M.S., Jung, M.S., Lee, K.O., Do, Lee., Kim, S.B. y Bae, K.S. 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *Journal of Microbiology* 43: 219-227.
- Paz-Aguilera, M., Beltrán, G., Ortega, D., Fernández, A., Jiménez, A. y Uceda, M. 2005. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry* 89: 387-391.

- Peyvandi, M., Farahani, F., Mazianani, H.M., Noormohamadi, Z., Ataii, S. y Asgharzade, A. 2010. *Pseudomonas* fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International journal of Plant Production* 4: 63-66.
- Picard, C., Frascaroli, E. y Bosco, M. 2004. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing rhizobacteria are differentially affected by the genotype of two maize inbreds lines and their hybrid. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 207-215.
- Prieto, P. y Mercado-Blanco, J. 2008. Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 297-306.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. y Moëgne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321:341-361.
- Rallo, P. y Martín, D.G.A. 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 984-989.
- Raudales, R.E., Stone, E. y McSpadden-Gardener, B. 2009. Seed treatment with 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads improves crop health in low-pH soils by altering patterns of nutrient uptake. *Phytopathology* 99: 506-511.
- Rengel, Z. y Marschner, P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168: 305-312.
- Rengel, Z., Gutteridge, R., Hirsch, P. y Hornby, D. 1996. Plant genotype, micronutrient fertilization and take-all infection influence bacterial populations in the rhizosphere of wheat. *Plant and Soil* 183: 269-277.
- Rumberger, A., Merwin, I.A. y Thies, J.E. 2007. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1645-1654.
- Rumberger, A., Yao, S., Merwin, I.A., Nelson, E.B. y Thies, J.E. 2004. Rootstock genotype and orchard replant position rather than soil fumigation or compost amendment determine tree growth and rhizosphere bacterial community composition in an apple replant soil. *Plant and Soil* 264: 247-260.
- Ryan, R. P., Dessaux, Y., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil* 321:363-383.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. y Dowling, D.N. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.

- Sanguin, H., Sarniguet, A., Gazengel, K., Moëgne-Loccoz, Y. y Grundmann, G.L. 2009. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist* 184: 694-707.
- Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M. y Millard, P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* 36: 146-155.
- Slininger, P.J. y Jackson, M.A. 1992. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 388-392.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. y Berg, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4742-4751.
- Sorensen, J. y Sessitch, A. 2007. Plant-associated bacteria-Lifestyle and molecular interactions. En: van Elsas, J.D., Janson J.K. y Trevors J.D. (eds.) *Modern Soil Microbiology* -second edition, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pgs. 211-236.
- Sun, L., Qiu F.B., Zhang X.X., Dai, X., Dong, X Z. y Song, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology* 55: 415-424.
- Ulrich, K., Ulrich, A. y Ewald, D. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 63:169–180.
- Vega, E.F., Pava-Ripoll, M., Posada, F. y Buyer, S.J. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal Basic Microbiology* 5: 371-380.
- Wang, G., Xu, J., Jin, J., Liu, J., Zhang, Q. y Liu, X. 2009. Effect of soil type and soybean genotype on fungal community in soybean rhizosphere during reproductive growth stages. *Plant Soil* 317: 135-144.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Weller, D.M, Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., *et al.* 2007. Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in plant defense. *Plant Biology* 9: 4-20.
- Wieland, G., Neumann, R. y Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere and rhizoplane in response to crop species, soil type and crop development. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5849-5854.

- Yang, Ch-H. y Crowley, D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied Environmental Microbiology* 66: 345-351.
- Yao, S., Merwin, I.A., Abawi, G.S. y Thies, J.E. 2006. Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 587–599.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, B.N., Feng, Z., Kuckzmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Barletta, A.R.G. y Vidaver, A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2198-2208.

CAPÍTULO V

V

Las comunidades bacterianas asociadas a la raíz de olivos silvestres (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) constituyen reservorios únicos de bacterias con potencial antagonista frente a *Verticillium dahliae* Kleb.

En este capítulo se recogen los resultados relativos al objetivo primero y tercero de esta Tesis Doctoral, en el cual se pretendía:

Determinar la estructura y diversidad genética de las comunidades bacterianas totales en el sistema radical de acebuches silvestres (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) en ecosistemas naturales, mediante diversos métodos biotecnológicos de análisis de poblaciones microbianas.

Constituir, identificar y caracterizar una colección de aislados de rizobacterias de olivo silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) que presenten alta actividad antagonista contra el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* Kleb. y determinar su potencial antagonista mediante selección asistida utilizando marcadores fenotípicos y moleculares.

V.1. RESUMEN

El olivo silvestre, llamado acebuche, es considerado el ancestro de las variedades de olivo cultivado, que es uno de los cultivos agrícolas más antiguos del mundo, y constituye una importante e inexplorada fuente de variabilidad genética que podría contener importantes caracteres de interés agronómico y biotecnológico. La longevidad y diversidad genética del olivo silvestre puede favorecer la selección de poblaciones rizosféricas bacterianas específicas y bien adaptadas que pueden constituir reservorios únicos de antagonistas microbianos contra *Verticillium dahliae*, el principal patógeno fúngico de este cultivo en todo el mundo. El objetivo del presente estudio fue examinar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en el suelo rizosférico y raíces de olivos silvestres de 11 reductos de acebuches en las provincias de Cádiz y Córdoba en Andalucía, al sur de España, mediante un enfoque de análisis polifásico. Primero, la ocurrencia y diversidad de bacterias asociadas a la raíz fue estudiada mediante un enfoque de cultivo-independiente, utilizando la técnica de análisis del Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción Terminal Fluorescente (FT-RFLP) de las secuencias amplificadas de la región 16S ADNr. Los patrones FT-RFLP revelaron una alta heterogeneidad en la composición de las comunidades bacterianas sugiriendo la existencia de comunidades específicas en función del genotipo de la planta y la localización geográfica de cada uno de los acebuches muestreados, siendo cada reducto de acebuche un reservorio único de diversidad. En segundo lugar, para investigar el potencial antagonista de las poblaciones bacterianas asociadas a la raíz, se aislaron un total de 675 bacterias de la rizosfera y endosfera y se determinó su antagonismo *in vitro* contra *V. dahliae* patotipo defoliante mediante un ensayo de cultivo duales. De los 675 aislados bacterianos evaluados, 94 de ellos (14,0%) mostraron una fuerte actividad antagonista contra *V. dahliae* y de éstos, la proporción más alta de antagonistas se obtuvo de la rizosfera (59,6%) en comparación con la endosfera (40,4%) de los

acebuches. En tercer lugar, el potencial biotecnológico de estos aislados fue evaluado mediante la producción *in vitro* de diferentes enzimas, ácido indol-3-acético (AIA) y compuestos antimicrobianos. En total, la mayoría de los antagonistas (entre un 58,5 a 78,3%), mostraron actividad proteolítica, lipolítica, quitinolítica, produjeron AIA y sideróforos. Finalmente, los 94 antagonistas bacterianos se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S del ADNr indicando que la mayoría de las bacterias pertenecen al género *Bacillus* (57,4%), *Pseudomonas* (27,0%) y *Paenibacillus* (7,4%). En general, varios de los aislados bacterianos mostraron un alto y amplio potencial antagonista y por lo tanto deben ser considerados para futuros estudios como potenciales agentes de biocontrol contra *V. dahliae* en el cultivo de olivo.

V.2. INTRODUCCIÓN

El olivo, árbol emblemático de la cuenca del mediterráneo, es una de las plantas domésticas cultivadas más antiguas (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). Se encuentra principalmente en dos formas, silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y cultivada (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) (Green, 2002). Por miles de años, el olivo ha sido culturalmente y económicamente el principal cultivo oleaginoso en la Cuenca del Mediterráneo, donde existen cerca de 9,5 millones de hectáreas las cuales representan el 95% del área total cultivada en el mundo (Angiolillo *et al.*, 1999; Bronzini *et al.*, 2002; Issaoui *et al.*, 2008; Sefc *et al.*, 2000). España es el mayor productor de aceite de oliva en el mundo, y Andalucía, la región sur del país, es la principal área de cultivo. Aproximadamente el 65% de las 2,5 millones de hectáreas del olivo cultivado en España se encuentran en Andalucía en donde se produce una tercera parte del total de aceite de olivo del mundo (CAP-JA, 2009).

Los olivares dominan el paisaje de Andalucía en un impresionante monocultivo que cubre aproximadamente el 17% de la superficie total de la

región, ocupando grandes extensiones de montañas y colinas del paisaje Mediterráneo. En este área, una excepcional presencia de bosques de olivos silvestres también representa un componente predominante y distintivo de la flora Mediterránea (Rubio de Casas *et al.*, 2002; 2006; Vargas y Kadereit, 2001). Mientras que los diferentes cultivares de olivo han sido seleccionados y propagados vegetativamente por el hombre, las poblaciones de olivo silvestre (acebuche) se reproducen sexualmente y son seleccionados naturalmente por factores medio ambientales. Como resultado de una temprana domesticación y un cultivo extensivo del olivo a través de la Cuenca del Mediterráneo, las formas de olivo silvestre actualmente observadas constituyen un escenario complejo, ya que se encuentran en un rango que van desde acebuches potencialmente verdaderos (formas silvestres presentes en áreas naturales) a formas asilvestradas (i.e., derivados sexuales secundarios de clones cultivados o productos de hibridación entre árboles cultivados y acebuches cercanos) (Angiolillo *et al.*, 1999; Lumaret *et al.*, 2004; Zohary y Hopf, 1994). Estas formas silvestres son genéticamente distintas y con mayor variabilidad que las variedades cultivadas y sus formas asilvestradas derivadas, situación que tiene importantes implicaciones para la conservación de linajes ancestrales (Lumaret y Ouazzani, 2001).

En años recientes, varias investigaciones se han centrado en el estudio de la variación genética de las poblaciones de olivo silvestre y sus relaciones filogenéticas con cultivares de olivo mediante el uso de diversos marcadores moleculares (e.g., Belaj *et al.*, 2007; Besnard *et al.*, 2002, 2007; Breton *et al.*, 2008; Lumaret y Ouazzani, 2001; Lumaret *et al.*, 2004; Rubio de Casas *et al.*, 2006). Recientemente en Andalucía se ha demostrado, mediante marcadores de repetición de secuencias simples (SSR) y análisis de aloenzimas, que los olivos silvestres representan una importante fuente de variabilidad genética y que acebuches silvestres verdaderos aún sobreviven en el sur de España (Belaj *et al.*, 2002, 2007, 2010; Lumaret *et al.*, 2004; Rubio de Casas *et al.*, 2006).

En el área del Mediterráneo, la producción del cultivo del olivo puede ser amenazada por diferentes enfermedades, principalmente de etiología fúngica. En este contexto, la Verticilosis, causada por el hongo patógeno del suelo *Verticillium dahliae* Kleb., es considerada una de las enfermedades más importantes y serias que afectan el cultivo del olivo en todo el mundo. En base a su virulencia diferencial en los árboles de olivo, *V. dahliae* puede ser clasificado como patotipo defoliante y no defoliante (Jiménez-Díaz *et al.*, 2010; Navas-Cortés *et al.*, 2008). Las infecciones causadas por el patotipo defoliante pueden ser letales para las plantas de olivo y actualmente son la causa de severos ataques que pueden originar dramáticas pérdidas en el rendimiento de plantaciones comerciales de olivo en el sur de España, constituyendo hasta el momento la principal amenaza para la industria del olivo en esta región (Jiménez-Díaz *et al.*, 1998; Navas-Cortés *et al.*, 2008).

Actualmente, la única estrategia de manejo para controlar esta enfermedad es de manera preventiva (i.e., evitando el uso de plantones de olivo infectados o suelos conteniendo inóculo del patógeno) debido a la falta de disponibilidad de variedades resistentes y/o fungicidas efectivos (Navas-Cortés *et al.*, 2008). Por esta razón, es necesario buscar nuevas estrategias medioambientalmente respetuosas para el control de esta enfermedad. Una de estas estrategias puede ser el uso de antagonistas como agentes de biocontrol, la cual es considerada una alternativa o una vía complementaria para reducir el uso de productos químicos en la agricultura (Berg *et al.*, 2005a; Paulin *et al.*, 2009; Raaijmakers y Weller, 2001). Por lo tanto, el uso de plantones de olivo certificados libres de *V. dahliae* y la protección de su sistema radical de la infección por presencia de inóculo en el suelo o inóculo nuevo entrante de *V. dahliae*, podría ser una estrategia apropiada para reducir el potencial de enfermedad en árboles jóvenes.

Los genes que codifican resistencia para algunos de los patógenos del suelo de mayor importancia y extensión que causan Podredumbres en la raíz y el cuello, Muerte de Plántulas y Marchiteces están frecuentemente

ausentes en especies de plantas cultivadas. Como alternativa, las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia para estimular y promover el desarrollo de grupos específicos de microorganismos antagonistas autóctonos como primera línea de defensa contra patógenos del suelo (Cook *et al.*, 1995; Landa *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2007). Por lo tanto, el sistema radical de la planta es un importante nicho de microorganismos que pueden constituir un reservorio inexplorado de antagonistas contra patógenos de plantas. En particular, las bacterias asociadas a las plantas que muestran diferentes propiedades antagonistas pueden ser encontradas en la rizosfera y dentro de los tejidos de las plantas sanas como endofitos. Además, diversas investigaciones sobre comunidades bacterianas en el suelo rizosférico y raíces de muchas especies de plantas han demostrado que producen efectos beneficiosos en el crecimiento y sanidad de las mismas tanto directa como indirectamente, y que estas comunidades bacterianas están fuertemente influenciadas por la especie de la planta y viceversa (Ahn *et al.*, 2007; Berg *et al.*, 2005b; Germida *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2008; Marilley y Arango, 1999; Mendes *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2005). Por lo tanto, las comunidades bacterianas autóctonas podrían ser consideradas una importante fuente de nuevos aislados microbianos tales como los involucrados en la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y componentes antimicrobianos, promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica en la planta que podrían ser utilizados para futuras aplicaciones biotecnológicas como el desarrollo de agentes de control biológico de organismos fitopatógenos o para el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos (Berg *et al.*, 2005b, Germida *et al.*, 1998; Mendes *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2004).

En este contexto, las especies de plantas cultivadas de gran longevidad y sus parientes silvestres podrían constituir un nicho ideal para explorar nuevos aislados bacterianos con diversos mecanismos de antagonismo contra patógenos fúngicos. Por tanto, el acebuche puede representar una fuente importante e inexplorada de variabilidad genética que podría contener no solamente caracteres de interés agronómico que

podieran ser raros o ausentes en las variedades cultivadas (Colella *et al.*, 2008), sino también albergar comunidades microbianas con una estructura distintiva comparada con las presentes en el olivo cultivado. Además, la gran longevidad de estos árboles podría favorecer la selección de poblaciones bacterianas rizosféricas específicas y bien adaptadas que pueden constituir reservorios únicos de antagonistas microbianos contra el principal patógeno fúngico asociado a la raíz del olivo como lo es *V. dahliae*.

Hasta ahora, pocas investigaciones (e.g., Hernesmaa *et al.*, 2005; Muleta *et al.*, 2009; Rumberger *et al.*, 2007) se han enfocado en el estudio de la diversidad y estructura de las poblaciones microbianas asociadas con plantas leñosas. Actualmente, de acuerdo a nuestra información, este trabajo representa el primer estudio centrado en determinar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en el suelo rizosférico y raíces de olivos silvestres en Andalucía y su potencial como una nueva fuente de antagonistas contra *V. dahliae*.

Los objetivos específicos del presente Capítulo fueron: (i) examinar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo rizosférico y raíces de olivos silvestres mediante un enfoque molecular cultivo-independiente y correlacionarlo con la diversidad genética de las poblaciones de olivo silvestre muestreados en la región de Andalucía, sur de España. (ii) Evaluar el potencial antagonista *in vitro* de los aislados bacterianos obtenidos mediante técnicas cultivo-dependientes de la rizosfera y endosfera de olivos silvestres contra *V. dahliae* patotipo defoliante. (iii) Identificar los antagonistas de *V. dahliae* seleccionados y caracterizar su potencial biotecnológico mediante evaluación *in vitro* de la producción de ácido indol-3-acético y diversos compuestos antimicrobianos.

V.3. MATERIALES Y MÉTODOS

V.3.1. Áreas de muestreo

Entre los olivo silvestres, se han reconocido dos formas distintas; los acebuches verdaderos (formas silvestres presentes en áreas no perturbadas) y formas asilvestradas los cuales ocurren en hábitats secundarios (i.e., áreas perturbadas o campos abandonados) que pueden ser plántulas originadas de variedades de clones cultivados o hibridaciones entre acebuches verdaderos y cultivares de olivo (Angiolillo *et al.*, 1999; Besnard y Bervillé, 2000; Lumaret *et al.*, 2004; Zohary y Hopf, 1994).

En este estudio se obtuvieron y utilizaron 11 muestras que potencialmente incluían acebuches verdaderos procedentes de dos provincias (Cádiz y Córdoba) en Andalucía, sur de España (Tabla V.1; Fig. V.1 y Fig. V.3A).

Tabla V.1. Localización y características de las muestras de acebuches utilizadas en este estudio

Código muestra	Genotipo olivo (edad en años) ^a	Localización	Coordenadas	Alt ^b (m)	Clasificación Climática
M1	W (>200)	Cádiz, 4,1 km S Ubrique	36°38'27.38"N 5°26'37.53"O	361	Marítimo Mediterráneo
M2	W (>200)	Cádiz, 1,0 km SW Benaocaz	36°41'28.09"N 5°25'35.34"O	744	Marítimo Mediterráneo
M3	W (>200)	Cádiz, 0,5 km E Villaluenga del Rosario	36°41'42.79"N 5°22'57.22"O	828	Marítimo Mediterráneo
LO	W (>200)	Cádiz, 8,0 Km SW Benalup-Casas Viejas	36°18'43.65"N 5°54'1.14" O	53	Marítimo Mediterráneo
LOBA	W (>200)	7,4 Km SW Benalup-Casas Viejas	36°18'26.64" N 5°52'56.01" O	47	Marítimo Mediterráneo
NAJARA-1	W (>200)	Cádiz, 4,8 km NE Vejer de la Frontera	36°17'25.14"N 5°55'59.64"O	42	Marítimo Mediterráneo
NAJARA-2	W (>200)	Cádiz, 4,8 km NE Vejer de la Frontera	36°17'24.82"N 5°55'58.75"O	43	Marítimo Mediterráneo
BAETICA	W (>200)	Cádiz, 1,5 km E Vejer de la Frontera	36°14'32.64" N 5°57'1.63" O	14	Marítimo Mediterráneo
MACO	F (>100)	Córdoba, 0,6 Km NE Medina Azahara	37°53'18.24"N 4°52'6.31"O	252	Mediterráneo Subtropical
LOMCO	F-C (>100)	Córdoba, 5,9 Km N Córdoba	37°56'1.98"N 4°48'23.33"O	352	Mediterráneo Subtropical
EPCO	F-C (>100)	Córdoba, 4,5 Km NW Córdoba	37°54'47.91"N 4°48'54.94"O	261	Mediterráneo Subtropical

^a Silvestre (W), Asilvestrado (F), Cultivado (C) hipótesis tipo de acuerdo con criterios medioambientales, históricos y demográficos

^b Altitud sobre el nivel del mar

^c Clasificación climática (J. Papadakis) obtenida de SigMapa, Sistema de Información Geográfica del Ministerio de "Medioambiente, Rural y Marino" de España (<http://sig.mapa.es/geoportat/>).



Figura V.1. Localización de los reducidos de acebuches muestreados en las provincias de Cádiz y Córdoba, en Andalucía, sur de España.

Varios de los lugares muestreados en la provincia de Cádiz fueron considerados como buenos candidatos para albergar olivos silvestres genuinos de acuerdo con los criterios definidos por Lumaret *et al.* (2004): (i) condiciones climáticas pasadas y presentes adecuadas para el crecimiento del olivo silvestre (variantes húmedos y subhúmedos de clima termomediterráneo con un promedio de temperatura mínima del mes más frío y precipitación anual superior a los 5°C y 450 mm respectivamente) y ii) aislamiento pasado y presente (usualmente más de 10 km) de las áreas de olivo cultivado. Algunas de estas poblaciones de acebuche fueron localizadas en bosques perennes de encinas en áreas irregulares que actualmente han llegado a ser reservas naturales. Los tres lugares muestreados en la provincia de Córdoba fueron localizados en hábitats no perturbados por cultivos, incluyendo formaciones degradadas y olivares abandonados que contenían formas asilvestradas y cultivares de olivos. Las coordenadas y la altitud de las zonas muestreadas se determinaron mediante un sistema de posicionamiento global (GPS) con resolución menor a un metro (Tabla V.1; Fig. V.1). La clasificación climática (J. Papadakis), , la temperatura media, mínima, y máxima anual (°C) y la precipitación anual (mm) se obtuvieron de SigMapa, Sistema de

Información Geográfica del Ministerio español de "Medio Ambiente, Rural y Marino" ([http:// sig.mapa.es / geoportal /](http://sig.mapa.es/geoportal/)) (Tabla V.1, Fig. V.2).

V.3.2. Muestras de raíces y suelo rizosférico

Las muestras de suelo y raíces (Fig. V.3B) se tomaron de tres puntos por árbol a una profundidad de 5-30 cm dentro del área de cobertura de la copa de los olivos (cerca de la zona de influencia de raíces; i.e., suelo rizosférico). Se obtuvo una muestra compuesta mediante la mezcla de raíces y suelo rizosférico de al menos cinco árboles por cada zona muestreada. Las muestras fueron inmediatamente almacenadas a 4°C en bolsas de plástico sin cerrar completamente, para asegurar suficiente aireación y prevenir pérdida de humedad hasta la evaluación de la estructura de las comunidades bacterianas. Los remanentes del suelo rizosférico fueron aireados y tamizados (malla de 2 a 5 mm) previo al análisis físico-químico. Las propiedades físico-químicas analizadas del suelo de cada zona incluyeron: textura, pH, carbono orgánico (SOC), contenido de nitrógeno (N) y la capacidad de intercambio catiónico (CEC) se determinó mediante la metodología descrita previamente por Álvarez *et al.* (2007) en el Laboratorio Oficial Agroalimentario de Córdoba, España y se encuentran incluidas en la Figura V.2.

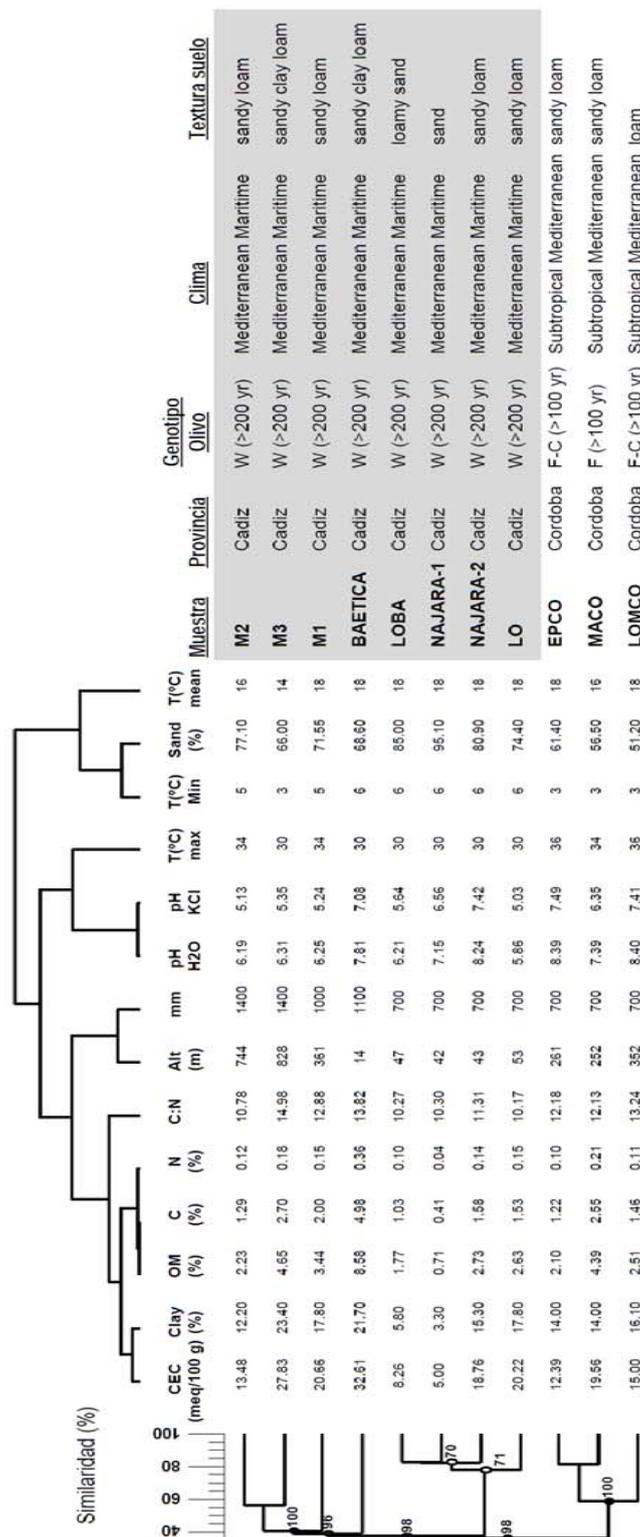


Figura V. 2. Análisis de agregación de los datos combinados de las características climáticas y físico-químicas de suelos de los lugares muestreados en el estudio. Todas las propiedades del suelo fueron estimadas según la metodología descrita previamente (Álvarez *et al.*, (2007) por el Laboratorio Oficial Agroalimentario de Córdoba (Córdoba, España) y las características climáticas se obtuvieron a partir SIGMAPA, Sistema de Información Geográfica del Ministerio español de "Medioambiente, Medio Rural y Marino" (<http://sig.mapa.es/geoportal/>). Valores de "bootstrap" se indican en cada nodo. Silvestre (W), Asilvestrado (F), Cultivado (C) hipótesis tipo de acuerdo con criterios medioambientales, históricos y demográficos. Las localizaciones con acebuches verdaderos se encuentran marcadas en la figura.

V.3.3. Extracción de ADN y genotipado de acebuches mediante microsatélites

Para caracterizar la diversidad genética de los acebuches de cada lugar muestreado, el ADN genómico total se extrajo de las muestras de raíces compuestas obtenidas de cada árbol de olivo silvestre. El ADN se extrajo de tres repeticiones (50 mg/ repetición) por lugar muestreado utilizando el kit de extracción comercial 'G-Spin™ IIp Plant Genomic DNA Extraction Kit' (Intron Biotechnology, Corea) y el sistema Fast Prep Bio 101 (MP Biomedicals Inc., Francia) siguiendo el protocolo descrito por Landa *et al.* (2007). Las condiciones de PCR descritas por de la Rosa *et al.* (2002) se utilizaron para la amplificación con los siguientes pares de iniciadores SSR: *ssrOeUA-DCA03*, *ssrOeUA-DCA09*, *ssrOeUA-DCA16* y *ssrOeUA-DCA18* (Sefc *et al.*, 2000), y *UDO99-043* (Cipriani *et al.*, 2002). Estos iniciadores SSR se seleccionaron debido a que han demostrado ser los más adecuados e informativos y muestran el más alto poder de discriminación (número de loci/alelos) para estudios de poblaciones de olivo cultivado y silvestre (Baldoni *et al.*, 2009; Belaj *et al.*, 2007).

La detección de productos se realizó mediante un secuenciador multicapilar automatizado (Modelo 3130XL genetic analyzer; Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, España. La asignación de tamaños se realizó utilizando ROX500 como estándar y el programa Genmapper 3.7 de Applied Biosystems como fue descrito anteriormente por Belaj *et al.*, (2007).

V.3.4. Extracción de las comunidades bacterianas de la rizosfera y endosfera

Las muestras de raíces intactas, se agitaron cuidadosamente de forma manual para remover todo el suelo excepto el que naturalmente está

adherido a las raíces. Las muestras compuestas de raíces se cortaron en fragmentos de 1 cm con unas tijeras estériles para obtener una muestra uniforme por lugar de muestreo. Las suspensiones de la rizosfera se obtuvieron agitando vigorosamente 2 g de los fragmentos de raíces en 20 ml de agua destilada estéril utilizando un agitador orbital durante 10 minutos y posteriormente se sometió a un baño de ultrasonido (Ultrasons, JP Selecta SA, Barcelona, España). La suspensión resultante se consideró que contenía las poblaciones bacterianas de la rizosfera. Para la extracción del ADN del suelo rizosférico, se recogió el 'pellet' o precipitado obtenido a partir de la centrifugación consecutiva a 11,000 rpm durante 4 minutos de 3 ml de la suspensiones de la rizosfera. Para el estudio de las poblaciones de la endosfera de la raíz, los fragmentos de raíz (2 g) fueron esterilizados superficialmente con una solución al 2% de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 3 minutos y un lavado durante tres veces consecutivas con agua destilada estéril. Las muestras de raíz fueron trituradas utilizando un molino (Bosh MMB 2000, Robert Bosch España, S.A., Madrid, España) con 100 ml de agua destilada estéril. La suspensión resultante se consideró que contenía las comunidades bacterianas de la endosfera. Para confirmar que la esterilización superficial de las raíces fue correctamente realizada, se utilizaron alícuotas de 100 µl del agua utilizada en el último paso de lavado de las muestras de raíces y fueron sembradas en placas con medio de cultivo R2A agar (Biolife Italiana S.r.l. Milan, Italia). El crecimiento bacteriano en las placas se observó después de un periodo de incubación a 28°C durante 3 días.

Las suspensiones de la rizosfera y endosfera fueron diluidas en serie y sembradas en el medio R2A agar (100 µl de cada serie de dilución con tres placas-repeticiones por dilución). Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C. Se seleccionaron las diluciones más adecuadas y se realizó el conteo de colonias después de cuatro días de crecimiento en las condiciones anteriormente mencionadas (Fig. V.3C). Por cada sitio de muestreo, se seleccionaron aproximadamente 40 y 25 aislados de la rizosfera y endosfera, respectivamente (Fig. V.3D), que fueron

considerados representativos del total de bacterias presentes en las placas después de la observación visual y óptica mediante un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500, Japón), identificando diferentes colores, texturas o morfologías de las colonias.

V.3.5. Extracción de ADN de la rizosfera

La extracción del ADN de la rizosfera se realizó mediante el kit de extracción “MoBio Ultraclean™ Soil DNA” (MoBio laboratories, Inc; Carlsbad, CA, EE.UU.). Los “pellets” o precipitados de las suspensiones de la rizosfera (aproximadamente 200 mg) se agitaron en el sistema FastPrep-24 (MP Biomedicals, Inc. Francia) a 6.0 m/s por 40 s para disgregar las partículas de suelo y las células bacterianas. Posteriormente, el ADN fue extraído de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue diluido en agua estéril ultrapura (Sigma, Madrid, España), se evaluó la integridad y calidad del ADN extraído mediante tinción con bromuro de etidio y se cuantificó en triplicado utilizando el Quant-iT DNA Assay Kit Broad Range fluorometric assay (Molecular Probes Inc., Leiden, Holanda) y un espectrofotómetro modelo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). Las concentraciones de ADN obtenidas variaron en un rango de 10 a 30 ng/μl y de 3 a 15 ng/μl para las muestras de suelo y rizosfera, respectivamente, que fueron utilizadas directamente para la amplificación.

V.3.6. Perfil de las comunidades bacterianas rizosféricas

La estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera de olivo silvestre fue estudiada mediante un enfoque molecular utilizando el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminales Fluorescentes (FT-RFLP, siglas en inglés) de las secuencias

amplificadas de la región 16S del ADNr. Los genes 16S del ADNr se amplificaron utilizando los iniciadores 8f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -3') (Weisburg *et al.*, 1991). El iniciador 8f fue marcado con FAM (6-carboxyfluoresceína) para la visualización de los fragmentos de restricción terminal (TRF). La reacción PCR se realizó en un volumen final de 25 µl utilizando 2.5 µl 10x buffer libre de Mg, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 15 µl de agua ultra-pura estéril (Sigma, Molecular Biology Reagent), 1 mM de cada iniciador, 0.5 µg RNasa, 0.33 µl de BiotaqTM polimerasa (BioLine, Londres, Reino Unido) y 2.5 µl del ADN diana de las muestras de rizosfera. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 Bio-Rad (Bio-Rad, Madrid, España) y el programa para la amplificación constó de un paso de 5 min de desnaturalización inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 45 s y 70 °C por 1 min, y una extensión final a 70 °C por 8 min. El éxito en la amplificación de la PCR fue inicialmente verificada mediante electroforesis en gel de agarosa antes de realizar el análisis FT-RFLP (Fig. V.3J).

Para la digestión de los productos de PCR amplificados, se utilizaron las enzimas de restricción *MspI* y *RsaI* (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). La digestión se realizó en 10 µl de reacción conteniendo 5 unidades de las enzimas *MspI* o *RsaI*, y 4 µl del producto de PCR marcado. Las digestiones fueron realizadas a 37 °C durante 3 h seguidas de un paso de inactivación de 65 °C durante 10 min. Cuatro microlitros del ADN digerido se diluyeron en 6 µl de agua para el análisis de fragmentos. Los TRFs fueron separados en un analizador genético 3130XL (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados utilizando el estándar de tamaño ROX500, y las matrices que contenían la incidencia, así como la altura y área de los picos de los datos individuales de TRF de todas las muestras se generaron con el paquete estadístico Genemapper version 3.7 (Applied Biosystems). Los picos menores de 100 unidades de fluorescencia y 50 pb

no fueron incluidos en el análisis para eliminar los dímeros de iniciadores y otras pequeñas moléculas presentes en los perfiles, así como aquellos TRFs que no se encontraban presentes en al menos dos de las tres repeticiones de los perfiles. También los TRFs que difirieron en menos de 1 pb fueron agrupados, a menos que los picos individuales fueran detectados de una forma reproducible. Finalmente los perfiles de FT-RFLP fueron estandarizados basándose en el método descrito previamente por Dunbar *et al.*, (2001). La abundancia relativa de cada TRF fue calculada como el ratio del área del pico para ese TRF respecto de la suma del área de todos los TRFs en el perfil, expresado en porcentaje.

V.3.7. Detección *in vitro* de bacterias antagonistas

La capacidad de los aislados bacterianos de la rizosfera y endosfera obtenidas de acebuches de inhibir el crecimiento fúngico *in vitro* de *V. dahliae* fue evaluada mediante el ensayo de cultivo dual en medio Waksman agar conteniendo por litro de medio: 5 g de proteosa-peptona (Panreac, Barcelona, España), 10 g glucosa (Panreac), 3 g extracto de carne (Sharlau Chemie, Barcelona, España), 5 g NaCl (Panreac) y 20 g agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.), y ajustando el pH final a 6.8. Se utilizó el aislado V138 de *V. dahliae* perteneciente al patotipo defoliante (Navas-Cortés *et al.*, 2008) que fue cultivado en medio Czapek-Dox-Broth (Difco) durante 14 días en un agitador orbital a 120 rpm y 25°C. La concentración de conidias en el medio líquido fue estimado mediante un hematocitómetro, y posteriormente se diluyeron en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración aproximada de 5×10^6 conidias/ml, Posteriormente, 100 µl de la suspensión de conidias fue sembrada en el medio cubriendo completamente la superficie del mismo, y éste se mantuvo en la cámara de flujo para su completa absorción y secado durante 30 min. Posteriormente, 5 µl de un cultivo en medio caldo soja triptona (Difco) de los aislados bacterianos en microplacas de 96 pocillos

tras 24 h de incubación a 28°C se inocularon sobre las placas conteniendo el medio Waksman agar y se incubaron a 28°C. Después de 5 días, se evaluó la anchura de las zonas de inhibición de la forma siguiente: (+++= 10-15 mm halo de inhibición, += 5-10 mm halo de inhibición, + = 1-5 mm halo de inhibición y - = sin halo de inhibición) (Fig. V.3E). Únicamente los aislados bacterianos que mostraron actividad antagonista *in vitro* contra *V. dahliae* fueron posteriormente caracterizados fenotípicamente y genotípicamente.

V.3.8. Producción de exoenzimas y metabolitos secundarios

La actividad quitinolítica, proteolítica y lipolítica de las bacterias antagonistas fue evaluada mediante el ensayo en placas con medio semicuantitativo (Chernin *et al.*, 1995). La actividad quitinasa (degradación del polímero β -1-4-glucosamina) fue evaluada en el medio mínimo quitina mediante la detección de zonas claras (halos) alrededor del crecimiento bacteriano después de 5 días de incubación a 30°C. La actividad proteasa (degradación de la caseína) se determinó a partir de la detección de halos en el medio leche desnatada agar (50 ml de leche desnatada esterilizada mezclada a 55°C con 50 ml de 1/5 de caldo soja triptona (TSB) y 4% de agar) después de 5 días de incubación a 30°C (Fig. V.3F). La actividad lipolítica fue evaluada utilizando el medio Tween 80 agar y fue determinada mediante la detección de zonas turbidas alrededor del crecimiento bacteriano (Fig. V.3I). La producción total de sideróforos se evaluó bajo condiciones limitantes de hierro mediante el ensayo universal de producción de sideróforos desarrollado por Schwyn y Neilands (1987) después de un periodo de incubación de 5 días a 30°C (Fig. V.3H). Las zonas de inhibición o presentando actividad fueron evaluadas de la siguiente forma: +++= >10 mm halo, += 5-10 mm halo, + = 1-5 mm halo y - = sin halo). La capacidad de los aislados bacterianos de producir ácido indol-3-acético (AIA) se determinó mediante el método de microplacas desarrollado por Sawar y Kremer (1995). La capacidad de los aislados de

Pseudomonas spp. de producir sideróforos fluorescentes fue evaluada mediante la siembra directa de las bacterias en medio B King (King *et al.*, 1954) incubadas a 25°C por 2 días y la inspección de las mismas bajo luz UV a 366 nm (Fig. V.3G). También, se correlacionó la capacidad de producir 2,4-diacetilfluoroglucinol de los aislados de *Pseudomonas* spp. con la presencia del gen *phlD* mediante ensayos PCR utilizando los iniciadores B2BF y BPR4 y las condiciones de amplificación descritas anteriormente por Landa *et al.*, (2002, 2006).

V.3.9. Identificación de las bacterias antagonistas

Todos los aislados bacterianos que mostraron actividad antagonista contra *V. dahliae* fueron identificados a nivel de género/especie mediante la secuenciación de la región 16S ADNr. Las amplificaciones fueron realizadas como se han descrito anteriormente y las secuencias fueron purificadas utilizando el kit de purificación “PureLink PCR Purification Kit” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La totalidad de la longitud de los fragmentos amplificados del 16S ADNr (~1,500 bp) fue secuenciada directamente utilizando ambos iniciadores (8f/1492r) en las instalaciones de STABVIDA (Caparica, Portugal). Las secuencias fueron alineadas y los errores de la secuencia consenso manualmente editadas utilizando el paquete informático Bionumerics 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Los aislados fueron identificados a nivel de género/especie por: (1) The Ribosomal Database Project's (<http://rdp.cme.msu.edu>) Naïve Bayesian Classifier (80% umbral de confianza), y (2) el algoritmo del “vecino más próximo” en la base de datos ‘nt’ del Genbank después del alineamiento con las secuencias de los genes 16S ADNr de referencia mediante el algoritmo BLAST de acuerdo con Altschul *et al.* (1997). Las secuencias 16S ADNr representativas de diferentes filum, clases, ordenes, familias y géneros de bacteria obtenidas en este trabajo fueron depositadas en la base de datos del GenBank.

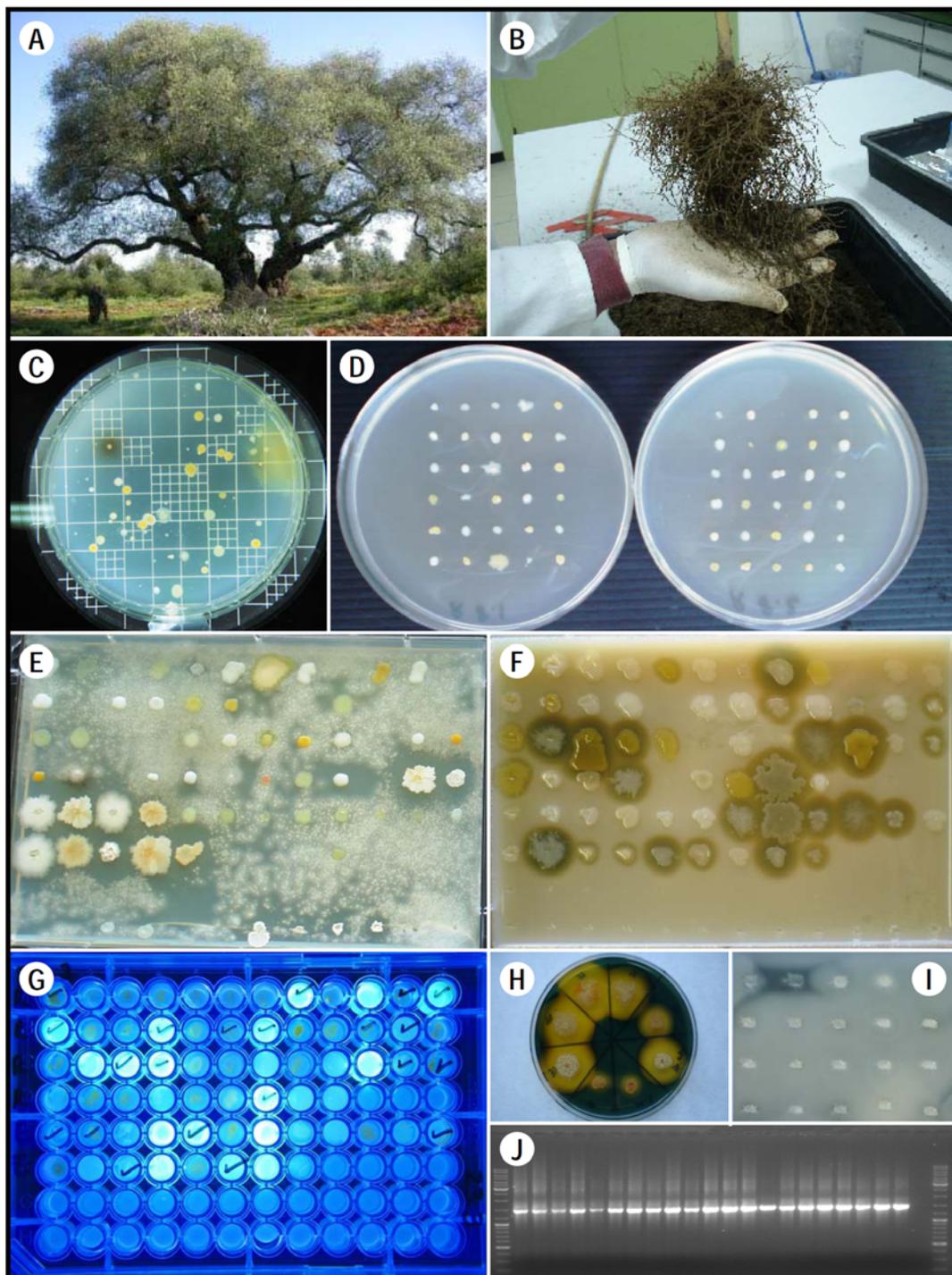


Figura V.3. Procedimiento para el aislamiento de aislados bacterianos procedentes de la rizosfera y endosfera de olivo silvestre y la caracterización del potencial antagonista frente *Verticillium dahliae* patotipo defoliante.

V.3.10. Análisis de datos

Los datos de densidad de población bacteriana (unidades formadoras de colonia, ufc) fueron convertidos al log ufc/g peso fresco de raíz para satisfacer los supuestos del test paramétrico del análisis estadístico utilizado. Los datos fueron analizados mediante STATISTIX 9.0 (Analytical Software, St. Paul, MN, EE.UU.). Las diferencias en las densidades de población entre tratamientos se determinaron mediante análisis de la varianza estándar y la comparación de medias entre tratamientos fue realizada mediante el Contraste Protegido de Fisher de las Mínimas Diferencias Significativas ($P= 0.05$).

Los datos de propiedades físico-químicas del suelo, características climáticas de las zonas muestreadas y los datos TRFs de los perfiles de las comunidades bacterianas (promedio de las tres repeticiones muestreadas por reducto de olivo silvestre) de la rizosfera fueron objeto de un análisis de componentes principales (PCA) y análisis de agregación utilizando la medida de distancia Euclídea al cuadrado. Los dendrogramas se construyeron utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con los paquetes estadísticos Bionumerics 6.1 y SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.).

Los estadísticos de diversidad fueron calculados a partir de perfiles normalizados de las muestras de la rizosfera mediante el número y área de los picos (TRFs) en cada perfil como representaciones del número y abundancia relativa de filotipos, según lo definido por Dunbar *et al.*, (2000). La riqueza de filotipos (S) fue calculada como el número total de TRFs con distinto tamaño (entre 50 y 500 pb) en el perfil. El índice de diversidad de Shannon-Weiner (Shannon y Weaver, 1963) fue calculado de la siguiente manera: $H = - \sum (p_i) (\log p_i)$, donde p es la proporción del área de un pico individual en relación con la suma de todas las áreas de los picos en una muestra (Hackl *et al.*, 2004).

Un esquema de evaluación similar al desarrollado por Faltin *et al.* (2004) se utilizó para caracterizar los aislados bacterianos con alto potencial antagonista y para comparar este potencial en base a la localización geográfica de la muestra, microhábitat (rizosfera o endosfera) e identidad de las especies. Para este propósito, se utilizó un sistema de puntuación donde se asignaron puntos para cada carácter bacteriano: hasta tres puntos en base a la anchura de la zona de inhibición o producción de un halo claro para la actividad antagonista hacia *V. dahliae* y para la producción de enzimas hidrolíticas, sideróforos, auxinas y fluorescencia en medio B de King. El total de puntos posibles de asignar fue de 21. Posteriormente, se calculó un Índice de Puntuación Relativo de Antagonismo (RASI) refiriendo la puntuación dada a cada carácter bacteriano respecto la máxima puntuación posible para cada carácter. Finalmente se realizó un análisis de agregación para los caracteres antagonistas fenotípicos mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el método de algoritmo UPGMA como se describió anteriormente.

V.4. RESULTADOS

V.4.1 Caracterización de las áreas de acebuches muestreadas en el estudio

El análisis combinado de las propiedades físico-químicas del suelo y las características climáticas diferenciaron a las once muestras de acebuche en tres grupos principales según su localización geográfica (Figs. V.1 y V.2). Las muestras procedentes de formas asilvestradas de olivo de la provincia de Córdoba pueden distinguirse claramente de los verdaderos olivos silvestres de la provincia de Cádiz (Fig. V.2). Al estimar la diversidad genética del ADN extraído de las muestras de raíces de los olivos silvestres y formas asilvestradas encontramos amplificaciones reproducibles y alelos discernibles sólo con las parejas de marcadores *ssrOeUA-DCA03* y *UDO99 043*. Sin embargo, estos resultados fueron

suficientes para determinar que las muestras de cada lugar constituirían un conjunto diferente de genes de olivo, con la provincia de Cádiz mostrando un mayor número de alelos que en la provincia de Córdoba (datos no presentados).

V.4.2 Perfiles de las comunidades bacterianas de acebuches

El ADN extraído directamente de los “pellets” de la rizosfera amplificaron con éxito productos de aproximadamente 1500 pb. Tanto la longitud del fragmento como el área del pico se consideraron como parámetros para la comparación de perfiles después de la normalización de los datos TRF según lo descrito por Hackl *et al.*, (2004). Se utilizaron dos enzimas de restricción para crear diferentes perfiles genéticos o 'fingerprints' de cada una de las muestras en el análisis de FT-RFLP. Ambas enzimas, *MspI* y *RsaI* produjeron de forma consistente un elevado número de picos con suficiente resolución que osciló entre 12-59 y 10-38 picos, respectivamente, dependiendo de la muestra de acebuche y la repetición. Con *MspI* se generó un número mucho mayor de TRFs diferentes (115) en comparación con *RsaI* (54). El término Riqueza en filotipos "S" se aplicó determinando el número de picos con intensidades > 50 UF y el índice de Shannon-Weiner se calculó como una medida de la diversidad, el cual mostró diferencias en función de la enzima de restricción utilizada y la muestras de la rizosfera de las diversas zonas de acebuche (Fig. V.4). Hubo diferencias de Riqueza y de los valores del índice de Shannon-Weiner dependiendo del enzima de restricción utilizado y de la localización de la muestra de acebuche sin seguir ningún patrón general (Fig. V.4).

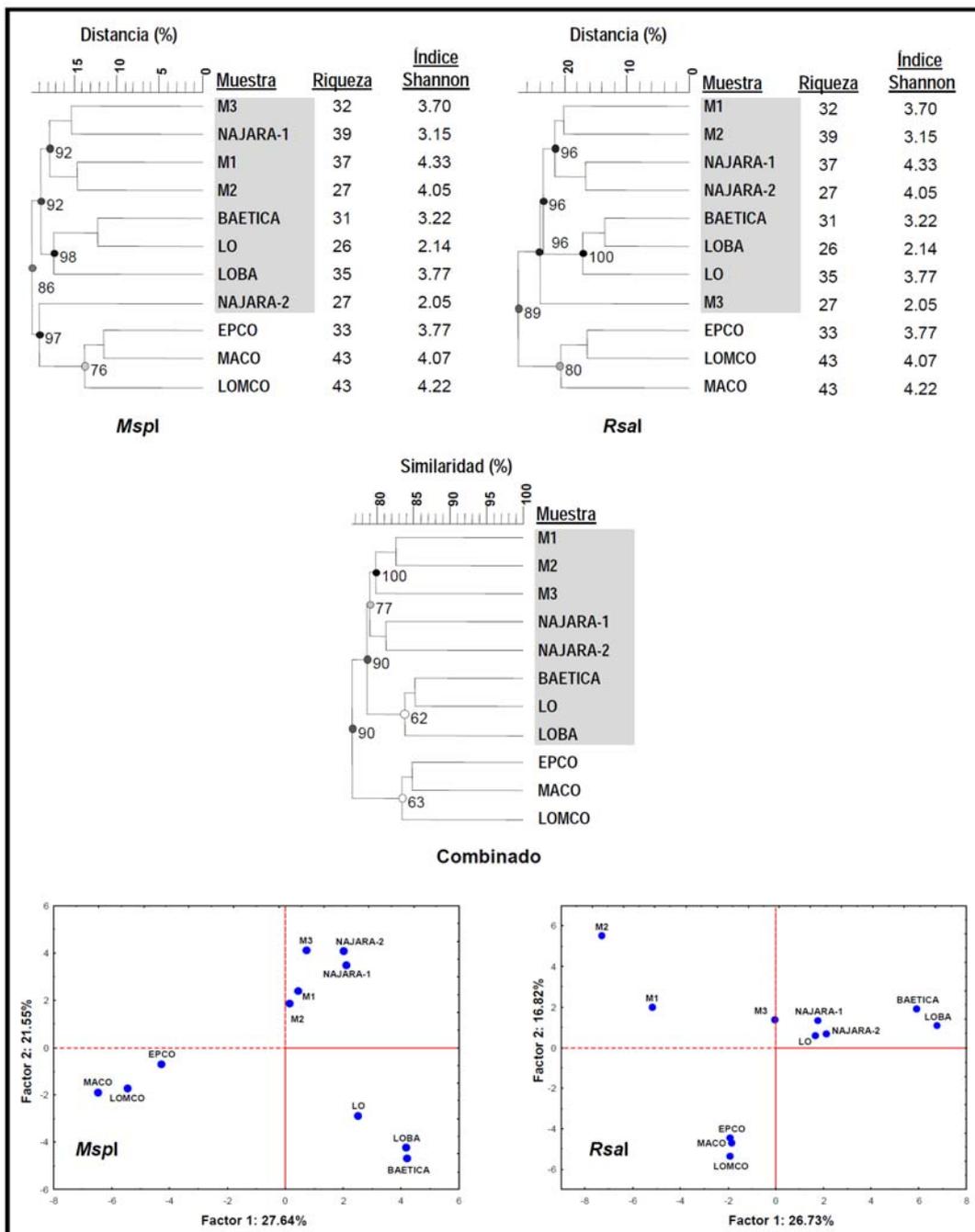


Figura V.4. Análisis de agregación de los perfiles de fragmentos de restricción terminales fluorescentes de la población de bacterias de la rizosfera de las once muestras de acebuches generados por los enzimas *MspI* y *RsaI*. Tres amplificaciones independientes se combinaron previamente al análisis para cada localización. El método UPGMA fue aplicado para generar la matriz de similitud de la abundancia relativa de cada uno de los fragmentos de restricción terminal (TRF) utilizando el coeficiente de la distancia Euclídea al cuadrado. El análisis combinado de agregación de los patrones TRFs de *MspI*+*RsaI* corresponden al promedio de los datos obtenidos con los dos enzimas de restricción analizados de forma independiente. La Riqueza (Número de TRFs) e Índice de diversidad de Shannon-Weiner para ambos enzimas de restricción fueron incluidos también para cada localización. Los valores de "Bootstrap" se indican en cada nodo. Las localizaciones con acebuches verdaderos se encuentran marcadas en la figura en un recuadro gris.

El análisis de agregación (UPGMA) y de PCA de los datos de TRFs analizados de forma independiente para *MspI* y *RsaI* o combinados (*MspI*+*RsaI*) de las once comunidades rizosféricas estudiadas reveló que cada reducto de acebuches constituye una reserva única de diversidad bacteriana (Fig. V.4). De este modo, las comunidades bacterianas de la rizosfera de acebuches parecen ser únicas, incluso cuando las muestras de la rizosfera se encuentran cercanas en su localización geográfica o proceden de suelos con propiedades físico-químicas del suelo similares (Fig. V.4). Por otra parte, las comunidades bacterianas rizosféricas de las formas asilvestradas de Córdoba se agrupaban juntas en un mismo grupo claramente diferenciado de los verdaderos acebuches silvestres de Cádiz (Fig. V.4).

V.4.3. Poblaciones de bacterias cultivables en la rizosfera y endosfera del sistema radical de acebuches

La densidad de población de bacterias cultivables de la rizosfera varió entre log 5,94 a 6,69 ufc/g de raíz y fue para todas las zonas de muestreo significativamente mayor ($P < 0,05$) que las poblaciones encontradas en el endosfera las cuales variaron entre log 2,51 y 4,93 unidades formadoras de colonia (ufc)/g de raíz (Tabla V.2). Los endofitos bacterianos en la localización EPCO estuvieron por debajo del límite de detección (Tabla V.2). En todos los casos existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las poblaciones bacterianas de la rizosfera y la endosfera para los lugares muestreados. En general, todas las muestras de la provincia de Córdoba, incluidas las formas asilvestradas mostraron poblaciones bacterianas tanto de la rizosfera como de la endosfera significativamente más bajas que las muestras de la provincia de Cádiz, que incluye las formas reales de olivo silvestre (Tabla V.2). Hubo una correlación positiva y significativa ($r = 0,7765$, $P = 0,0049$) entre las densidades de población de bacterias cultivables totales en la rizosfera y las que se encuentran en la endosfera.

Tabla V.2. Densidades de población de bacterias cultivables y aislados bacterianos antagonistas frente a *Verticillium dahliae* recuperados de la rizosfera y la endosfera de acebuches en las once localizaciones muestreadas en Andalucía, sur de España (Fig. V.1.)

Origen	Código muestra	Aislado bacteriano ^a		Nivel de población Log (ufc/g raíz) ^b	Antagonistas (%)
		Prefijo	Número		
Rizosfera	M1	RacM1-	1-7, 11-12, 66-70	5.93 de *	50.0
	M2	RacM2-	16-18, 22, 73	6.69 a *	20.0
	M3	RacM3-	76	6.48 a *	3.3
	LO	RacLO-	23-28	6.37 ab *	20.0
	LOBA	RacLOBA-	36-40, 60-64	6.25 abc *	16.7
	NAJARA-1	RacNa1-	56-58	6.33 ab *	13.3
	NAJARA-2	RacNa2	48-51	6.47 a *	13.6
	BAETICA	RacBaet-	78-80	6.46 ab *	10.0
	MACO	RacMACO-	86-90	5.94 cd *	16.7
	LOMCO	RacLOMCO-	91	6.12 bcd *	3.3
	EPCO	RacEPCO-	92-94	5.37 e *	10.0
Endosfera	M1	EacM1-	9-10, 71-72	4.76 ab	46.7
	M2	EacM2-	19-21, 74-75	4.93 ab	33.3
	M3	EacM3-	77	4.70 ab	6.6
	LO	EcLO-	29-35	4.78 ab	46.7
	LOBA	EacLOBA-	41-47, 65	4.74 a	46.7
	Najara-1	EcNa1-	59	4.08 abc	6.7
	Najara-2	EacNa2-	52-55	4.77 ab	26.7
	Baetica	EacBaet-	81-83	3.61 bc	20.0
	MACO	EacMACO-	84-85	2.51 de	13.3
	LOMCO	EacLOMCO-	-----	3.09 cd	0.0
	EPCO	EacEPCO-	-----	1.60 e (DL)	0.0

^a Los aislados bacterianos de cada localización fueron designados como Racx-y y Eacx-y, según origen en la raíz rizosfera o endosfera, respectivamente; donde 'x' representa el código de la muestra, e 'y' el número de aislado.

^b El tamaño de las poblaciones totales de bacterias fue determinado mediante dilución en placas en medio R2A.

^c La medias con diferente letras y/o asteriscos indican diferencias significativas entre localizaciones o entre los nichos de la raíz (rizosfera vs endosfera) de acuerdo con el contraste protegido de Fisher's de las Mínimas Diferencias Significativas ($P=0.05$). DL= Los niveles de población de algunas repeticiones estuvieron por debajo de límite de detección. Los datos de colonización fueron transformados a log (ufc/g de peso fresco de raíz) antes del análisis de datos.

V.4.4. Antagonismo *in vitro* frente a *Verticillium dahliae* Kleb

Un total de 675 aislados bacterianos fueron obtenidos de la rizosfera y la endosfera de olivo silvestre y evaluados por su actividad antagonista *in vitro* frente a *V. dahliae* patotipo defoliante (PD). De estos 675 aislados bacterianos, 94 (14%) mostraron altos niveles de actividad antagonista contra *V. dahliae* PD. De todas las muestras de la rizosfera y la endosfera de acebuches se obtuvieron aislados bacterianos con actividad antagonista frente a *V. dahliae* PD, con la excepción de dos muestras de la endosfera de las localizaciones LOMCO y EPCO (Tabla V.2). Es de destacar la correlación positiva y significativa encontrada entre los porcentajes de antagonistas encontrados en la rizosfera y la endosfera ($r = 0,6956$, $P = 0,0175$), y entre las densidades de población de bacterias cultivables totales en la endosfera y la proporción de antagonistas encontrados en este nicho ($r = 0,7396$, $P = 0,0093$). Sin embargo, esta correlación no se encontró en la rizosfera ($r = -0.1752$, $P = 0,6064$).

La mayoría de los antagonistas bacterianos fueron aislados de la rizosfera (59,6%), mientras que los antagonistas procedentes de la endosfera representaron el 40,4%. Los antagonistas bacterianos de la rizosfera y de la endosfera mostraron patrones de antagonismo similares con la mayoría de ellos mostrando actividad proteolítica (73,3%), lipolítica (76,4%) y quitinolítica (56,8%), y produciendo la hormona ácido indol-3-acético (75,3%) y sideróforos (76,0%). Dentro de los 26 aislados bacterianos identificados como *Pseudomonas* spp. (ver más abajo), la mayoría de ellos (76,9 %) produjeron pioverdinas en medio B de King detectado mediante fluorescencia bajo luz UV, y el 23,1% fueron positivos para *phlD* (Fig. V.5). Todos los aislados bacterianos mostraron al menos tres actividades antagonistas y el 21,3% de ellos las cinco actividades estudiadas (Fig. V.5). El índice de puntuación de antagonismo relativo (RASI) varió del 14,3 hasta 61,9% entre los 94 aislados bacterianos evaluados. No se encontró correlación entre el número de actividades antagonistas y valores del RASI y la procedencia de los aislados

bacterianos, fueran de la rizosfera o endosfera, localización o tipo de genotipo de la muestra de acebuche (Fig. V.5).

El análisis de agregación combinado los caracteres antagonistas fenotípicos llevado a cabo con el coeficiente de correlación de Pearson y con el algoritmo UPGMA reveló cuatro grupos principales, con una alta (> 70%) correlación cofenética, con un valor de corte del coeficiente de agregación del 26,1%. No se encontró correlación entre la ubicación de los aislados bacterianos en los cuatro grupos principales y su origen en la raíz (rizosfera vs endosfera) o la localización de muestreo (Fig. V.5). También se encontraron diferentes subgrupos que pueden ser identificados dentro de los cuatro grupos principales y que congregan aislados bacterianos de acuerdo a las diferentes propiedades antagonistas y a los valores RASI presentes en cada aislado bacteriano (Fig. V.5).

V.4.5. Identificación de bacterias antagonistas

Para evaluar la diversidad genética de los antagonistas bacterianos frente *V. dahliae* PD se obtuvieron las secuencias parciales 16S del ADNr (aproximadamente 1.400 pb). Las secuencias de los genes 16S del ADNr revelaron que cuatro fila de bacterias representaban todos los antagonistas bacterianos procedentes de todos los reductos de acebuches. (Fig. V.5, Tabla V.3). El filum *Firmicutes* fue el grupo filogenético más abundante en cuanto al número de aislados (52), representando el 62,8% de todas las bacterias examinadas, seguido por *Proteobacteria* con 32 aislados (34,0%). *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* fueron menos abundantes contando sólo con el 2,1% y 1,1% de los aislados, respectivamente.

Bacillus fue el principal taxon identificado representando el 56,4% del total de los antagonistas, seguido por *Pseudomonas* con 27,7%. Todas las especies de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. identificados fueron aisladas tanto de la rizosfera como de la endosfera. Sin embargo, mientras que todas las especies de *Bacillus* spp. identificadas se encontraron en

una proporción similar en la rizosfera (56,6%) y como endofitos de la raíz (43,4%), la mayoría de las especies de *Pseudomonas* spp. identificadas fueron aisladas de la rizosfera (73,1%) en comparación con los aislados de la endosfera (26,9%) (Fig. V.5, Tabla V.3). Usando la metodología del vecino más cercano en el GenBank 'nt' las especies de *Bacillus* más frecuentemente identificadas pertenecieron al grupo *B. subtilis/B. amyloliquefaciens* seguido del grupo *B. cereus/B. thuringiensis* (datos no presentados). En el caso de *Pseudomonas*, la mayoría de cepas de bacterias antagonistas no pudieron ser asignadas a nivel de especie, o si se hizo correspondieron a *P. fluorescens/P. reactans* y *P. brassicacearum* (datos no presentados). Otros antagonistas encontrados en una proporción minoritaria pertenecían al género *Paenibacillus* (7,4%), específicamente *P. polymyxa*, que fueron aislados tanto de la rizosfera como de la endosfera. Otras bacterias fueron identificadas como *Acinetobacter rhizosphaere* (aislados RacM1-1, RacMACO-86 y RacMACO 87) y *Rhodococcus wratislaviensis* (aislado RacM1-1) y fueron sólo encontrados en la rizosfera, mientras que dos aislados (RacM1-14 y RacM1-15) fueron identificados como *Chryseobacterium vrystaatense* y se encontraron sólo como endofitos de la raíz.

Tabla IV.3. Distribución taxonómica de los 94 aislamientos de bacterias antagonistas frente a *Verticillium dahliae* patotipo defoliante recuperados de la rizosfera y la endosfera de acebuches en Andalucía, España.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Origen ^a		(% ^b)
					Rizosfera	Endosfera	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	30	23	56.4
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	3	4	7.4
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	19	7	27.7
			Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	3		3.1
		Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Rahnella</i>		1	1.1
				<i>Erwinia</i>		1	1.1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1		1.1
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>		2	2.1

^a El número total de aislamientos bacterianos antagonistas asignado a cada población.

^b Proporción antagonistas bacterianos totales identificados procedentes de acebuches incluyendo ambas poblaciones.

La asignación a nivel de género de los diferentes aislados, anteriormente referida, se realizó con un umbral de confianza 100% utilizando el 'Naïve Bayesian Classifier of the Ribosomal Database Project' con la excepción de cuatro aislados, RacM1-70, RacLOBA-47, RacM2-20 y RacM1-2 que presentaron un umbral de confianza 69-76% en su asignación taxonómica, y que fueron identificados como *Bacillus* sp., *Rahnella aquatilis*, *Erwinia* sp. y *Pseudomonas* sp., respectivamente, utilizando la metodología del vecino más cercano en el GenBank 'nt' (Fig. V.5).

Los cuatro grupos definidos en el análisis UPGMA combinado de los caracteres antagonistas fenotípicos tuvieron alguna correlación con la identidad de las bacterias. Así, el grupo I estaba constituido en su totalidad por *Bacillus* spp., con la excepción de tres aislados bacterianos (un *Paenibacillus* sp., una *Pseudomonas* sp., y un *Chryseobacterium* sp.), el Grupo II fue el más diverso e incluyó representantes de todos los géneros identificados. Por el contrario, los Grupos III y IV fueron constituidos sólo por *Pseudomonas* spp., con el Grupo IV agrupando a todas las *Pseudomonas* que contenían el gen *phlD* (Fig. V.5).

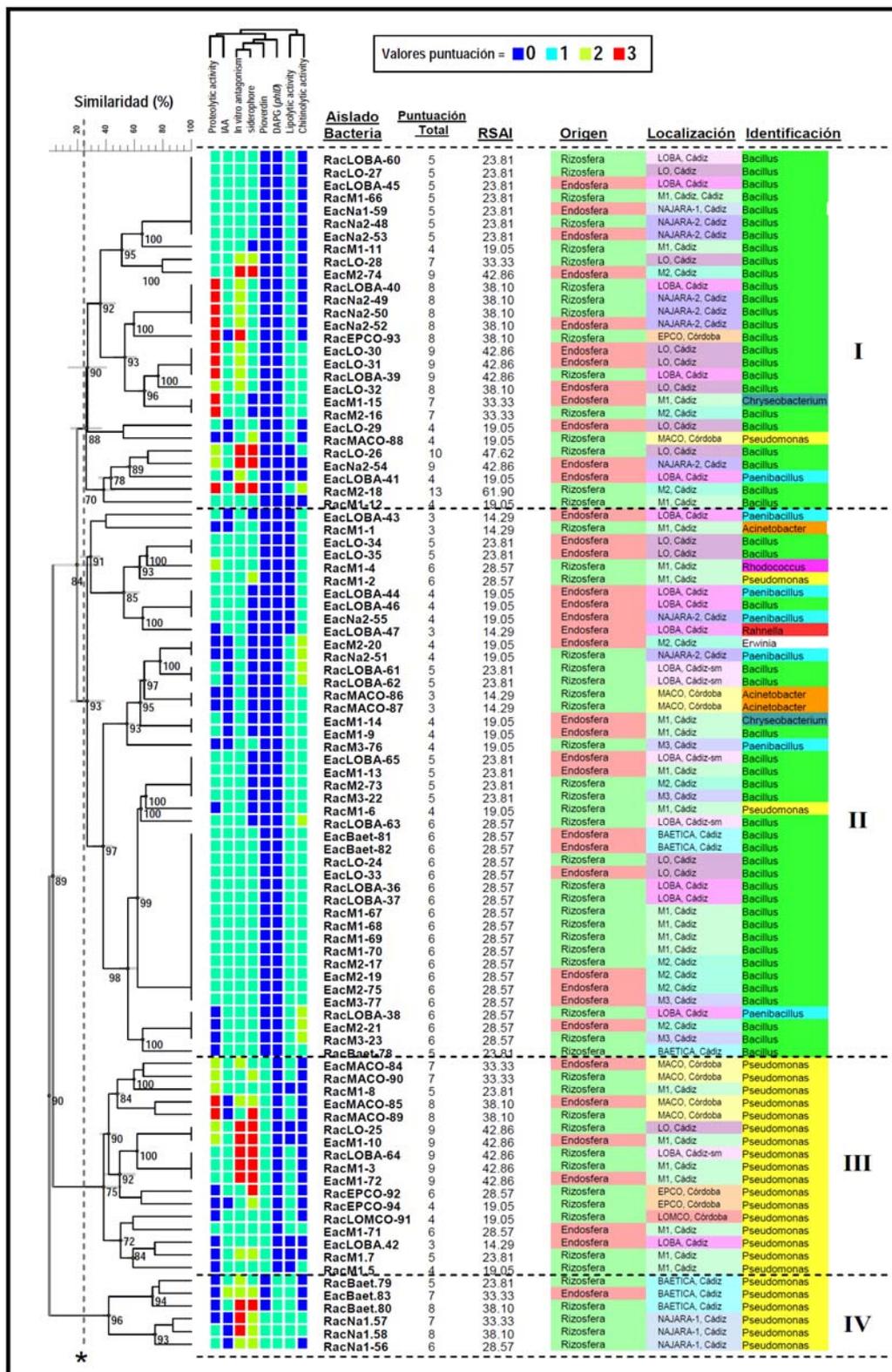


Figura V.5. Análisis de agregación de ocho características fenotípicas de antagonismo analizados con el coeficiente de correlación de Pearson y el algoritmo UPGMA. Valores de soporte estadístico o "Bootstrap" se indican en cada nodo. La puntuación de antagonismo total, y el índice de puntuación relativa de antagonismo (RSI), origen en la raíz, localización de la muestra y la identificación a nivel de género de las 94 aislados bacterianos se indican en la figura. (*) = Los grupos que fueron definidos en base a un valor del coeficiente de corte conjunto del 26,14%.

V.5. DISCUSIÓN

La Verticilosis ha sido descrita como uno de los problemas fitopatológicos más importantes en el cultivo del olivar en la Cuenca Mediterránea, incluyendo Andalucía, donde causa importantes pérdidas económicas. La Verticilosis del olivo se puede manejar de una forma más eficiente mediante la combinación de medidas preventivas de control tales como: (i) elección de la fecha de siembra y análisis de predicción del riesgo, (ii) uso de cultivares resistentes de olivo, y (iii) utilización de material de plantación libre del patógeno, etc. (Jiménez-Díaz *et al.*, 2010; Navas-Cortés *et al.*, 2008); cuya eficacia se podría ver reforzada por la protección del sistema radicular de la infección por el patógeno por diferentes medios, incluyendo la aplicación de agentes de biocontrol.

En efecto, el uso de agentes de biocontrol, incluyendo las bacterias, se ha incrementado en todo el mundo como una alternativa prometedora para el control de patógenos de plantas residentes en el suelo, principalmente en los sistemas de agricultura sostenible y orgánica, tales como los que se practican en muchas zonas de Andalucía para el cultivo del olivo. Las bacterias del suelo son un componente esencial de la comunidad biótica en los hábitats de árboles leñosos naturales y cultivados y son en gran parte responsable de funcionamiento de los ecosistemas, porque participan en la mayoría de las transformaciones de nutrientes. En este sentido, las rizobacterias han sido objeto de una amplia investigación entre los microbiólogos y agrónomos, debido a su profundo efecto sobre el crecimiento y la salud de las plantas, y como una fuente potencial de agentes de biocontrol de patógenos residentes en el suelo. En este contexto, los parientes silvestres de los árboles de gran longevidad, como los acebuches, que exhiben una alta variabilidad genética, podrían constituir un nicho ideal para la exploración de nuevas cepas bacterianas con diversos mecanismos de antagonismo frente a hongos fitopatógenos. El principal objetivo de nuestro estudio fue explorar la diversidad bacteriana

de la rizosfera de acebuches y aprovechar ésta como una fuente importante e inexplorada de antagonistas bacterianos contra *V. dahliae*.

Los resultados del análisis de diversidad genética de las muestras de acebuche mediante microsatélites y el análisis de agregación del conjunto de características fisicoquímicas del suelo y características climáticas indicaron que cada punto de muestreo difiere en los genotipos de olivo, el tipo de suelo y el clima. Así, el análisis de PCA y de UPGMA a partir de los datos de TRFs reveló la existencia de los mismos grupos principales que fueron mostrados por las características climáticas y del suelo de los diferentes ecosistemas muestreados, con las comunidades bacterianas de la rizosfera de acebuches verdaderos de la provincia de Cádiz diferenciándose en un grupo independiente de los supuestas formas asilvestradas de la provincia de Córdoba. Es interesante señalar que en un estudio reciente Belaj *et al.* (2010) observaron patrones de alta variación genética en acebuches en España, revelando que los acebuches en Cádiz, Andalucía, representan un fondo genético independiente que podía ser diferenciado de otros acebuches presentes en otras áreas y de todas las variedades cultivadas de olivo en España.

Se ha establecido que las especie de planta huésped, incluso el genotipo o variedad de una especie vegetal, y el tipo de suelo son los factores más importantes que determinan la estructura de las comunidades microbianas de la rizosfera. De hecho, se ha constatado que las variantes genotípicas naturales de una sola especie de planta seleccionarían la microbiota específica a partir del consorcio presente en el suelo como resultado de los perfiles de exudados único que presenta cada genotipo (Micallef *et al.*, 2009). De la misma manera los diferentes suelos tienen características físico-químicas distintas que influyen en las comunidades microbianas, ya que proporcionan un hábitat específico que contribuye a seleccionar determinadas comunidades bacterianas (Garveba *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). En este sentido, en otras especies de plantas leñosas como en el manzano, se han encontrado diferencias significativas en la composición de la comunidad de la rizosfera de acuerdo a las

características genéticas de los portainjertos, así como a las características del suelo (Rumberger *et al.*, 2007). Nuestros resultados indican que cada reducto de acebuches verdaderos constituye un reservorio único de diversidad bacteriana que puede ser diferenciada de las comunidades bacterianas de la rizosfera de olivos asilvestrados. Sin embargo cuál de estos factores: genotipo de la planta, tipo de suelo o clima es el principal promotor de la estructura de la comunidad bacteriana de estos acebuches no ha sido determinado todavía.

Los microorganismos endófitos han sido estudiados en varias plantas huésped. Sin embargo, según nuestro conocimiento las poblaciones de microorganismos endofitos naturales presentes en la raíz de los acebuches no se han estudiado todavía. En otras especies de plantas, se ha documentado que las bacterias de la endosfera se encuentran en niveles menores de densidad de población que las bacterias de la rizosfera. En nuestro estudio, se encontraron resultados similares en donde para todos los lugares muestreados tanto las poblaciones de bacterias como la proporción de los antagonistas encontrados fueron significativamente mayores en la rizosfera que en la endosfera. Se ha constatado que la densidad de población y diversidad de endófitos es muy variable, dependiendo principalmente de la especie bacteriana y el genotipo del huésped, pero también del estado de desarrollo de la planta huésped y de las condiciones ambientales (e.g., Ahn *et al.*, 2007; Marschner *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2007; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Nuestros resultados mostraron que las mismas especies de bacterias antagonistas (*Pseudomonas* y *Bacillus*) están presentes en los medioambientes de la rizosfera y de la endosfera en la mayoría de los lugares de muestreo, los que a su vez presentaban diferentes propiedades físico-químicas del suelo y condiciones ambientales sugiriendo una estrecha interacción entre estos géneros de bacterias y los acebuches.

En el presente estudio, 675 aislados bacterianos fueron obtenidos de la rizosfera y de la endosfera de acebuches y evaluados *in vitro* por su actividad antagonista frente a *V. dahliae* PD. De éstos, el 14% mostró un

alto nivel de antagonismo (capacidad de inhibición) frente al patógeno en cultivo dual *in vitro*. Menores proporciones de antagonistas (5,7 a 8,3%) en la población de bacterias cultivables totales ha sido encontrada en otros estudios (e.g., Berg *et al.*, 2002, Berg y Hallmann, 2006). En nuestro estudio, todos los reductos de acebuches muestreados albergaron antagonistas en la rizosfera y en la endosfera, y sólo en dos lugares, que contenían posibles formas asilvestradas de acebuches no pudieron aislarse antagonistas bacterianos de la endosfera. Sin embargo, cada lugar de muestreo difiere en gran medida en la proporción que representan las bacterias antagonistas con respecto al total de bacterias cultivables, oscilando entre 3,3% al 50,0%, a pesar de que el proceso de aislamiento y selección se llevó a cabo en las mismas condiciones. Como se ha indicado anteriormente, el genotipo del olivo silvestre, las características del suelo y el clima influyen en la estructura y la abundancia de las poblaciones de bacterias totales de la rizosfera y, de este modo, esos factores podrían afectar de manera diferente a las poblaciones específicas de bacterias antagonistas presentes en la rizosfera o la endosfera. Otros factores que podrían estar asociadas a procesos específicos de antagonismo y que podrían estar llevándose a cabo en localizaciones específicas de las raíces de los olivos han de estudiarse más a fondo.

En diferentes investigaciones (Berg *et al.*, 2002, 2006) se ha demostrado que las especies de plantas, el tipo de suelo (determinado por diferentes localizaciones) y el efecto de la rizosfera tienen una fuerte influencia sobre los antagonistas bacterianos de *Verticillium* asociados a las raíces de plantas huéspedes de este patógeno. De este modo, el efecto de la rizosfera en las comunidades bacterianas de antagonistas se reflejó en un incremento de aislados antagonistas y una mayor diversidad de determinados tipos genéticos ARDRA obtenidos de la rizosfera frente a una menor diversidad de antagonistas obtenidos del suelo circundante no rizosférico. Por otra parte, la proporción y la composición de los antagonistas bacterianos obtenidos de patata, colza y fresa se ha mostrado que está altamente influenciado por las especie de planta hospedadora, así

como por la etapa de crecimiento de ésta. En nuestro estudio encontramos que existe mayor diversidad de especies bacterianas y proporción de antagonistas en la rizosfera en comparación con la endosfera.

Bacillus spp. y *Pseudomonas* spp. fueron los antagonistas bacterianos predominantes en las raíces de los olivos silvestres. *Bacillus* spp. se encontró colonizando tanto la rizosfera como la endosfera en una proporción similar. En cambio, *Pseudomonas* spp. fue significativamente más abundantes en la rizosfera que en la endosfera. Nuestros resultados confirman los obtenidos en otras investigaciones que han descrito a *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. como los principales componentes de las comunidades microbianas asociadas raíz de muchas especies de plantas (Donate-Correa *et al.*, 2004; Poonguzhali *et al.*, 2006), que son capaces de colonizar la superficie de la raíz y pueden prevenir el desarrollo de patógenos de plantas y mejorar el crecimiento de éstas (Berg y Hallmann, 2006; Correa *et al.*, 2009; Debode *et al.*, 2007).

La capacidad de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos es bien conocida, habiéndose descrito como una de las rizobacterias beneficiosas más frecuente que muestran un amplio espectro antifúngico (Muleta *et al.*, 2007). En estudios cultivo-dependientes, *Pseudomonas* spp. aisladas de diferentes especies de plantas fueron las rizobacterias más abundantes con capacidad antagonista *in vitro* frente a *V. dahliae*, y su diversidad fue a la vez específica del lugar y de la planta de muestreo (Berg *et al.*, 2002, 2006). Recientemente, Muleta *et al.* (2007, 2009), evaluó *in vitro* el efecto antagonista de rizobacterias cultivables autóctonas asociadas con otro huésped leñoso, *Coffea arabica*, y encontró que la mayoría de las bacterias que muestran la actividad antagonista frente *Fusarium* spp. eran miembros de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp.. El predominio de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. cultivables en la rizosfera ha sido sugerido que puede estar condicionado por los medios de cultivo elegidos para realizar los aislamientos. En este estudio se utilizó medio R2A agar para el aislamiento de las bacterias cultivables más abundantes que habitan en raíces de olivo

silvestre. Nuestros resultados indican que tanto las poblaciones de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. representan una alta proporción de las poblaciones microbianas indígenas asociada a la rizosfera y a la endosfera de acebuches cuya función biológica y su papel en su asociación con las raíces de este árbol debería ser explorada para aplicaciones biotecnológicas futuras en los sistemas de cultivo de olivo.

Los integrantes de *Pseudomonas* spp. fueron principalmente dominados por *Pseudomonas* spp. no identificadas, o *P. fluorescens*/*P. reactans*, mientras que los integrantes de *Bacillus* spp. fueron principalmente *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens*. Otros antagonistas encontrados en menor proporción y sólo en la rizosfera fueron *Rhodococcus* sp. y *Acinetobacter* sp., mientras que *Erwinia* sp., *Chryseobacterium* sp. y *Rahnella* sp. sólo se encontraron en la endosfera. Mención especial merece el caso del antagonista *Rahnella aquatilis* que sólo se encontró en un lugar y en baja proporción. Nuestros resultados observados de actividad *in vitro* *R. aquatilis* frente a *V. dahliae* se encuentran en concordancia con lo observado por Uppal *et al.* (2008). Además, estudios previos han demostrado que las cepas de *R. aquatilis* producen diferentes sustancias inhibitoras con un amplio espectro de actividad frente a una serie de bacterias y hongos fitopatógenos de plantas (Calvo *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Jafra *et al.*, 2009).

Múltiples mecanismos de biocontrol han sido implicados en la supresión de enfermedades de raíz causadas por hongos mediante *Pseudomonas* y *Bacillus* incluyendo: i) la producción de antibióticos, toxinas, bio-surfactantes y enzimas líticas, ii) competencia por los nichos de la raíz, nutrientes y minerales y, iv) inducción de resistencia sistémica. Esto ha llevado a sugerir que el principal éxito de un agente de biocontrol es atribuible en gran parte a las presencia de múltiples mecanismos de biocontrol (Vassilev *et al.*, 2006). En este sentido, algunas de las *Pseudomonas* y los *Bacillus* antagonistas con mayor actividad contra *V. dahliae* fueron los aislados que albergan el mayor número de características antagonistas. De este modo, todas las cepas antagonistas

mostraron al menos tres mecanismos (principalmente la actividad lipolítica y proteolítica, producción de diferentes niveles de ácido indol-3-acético (AIA) y sideróforos), y un alto porcentaje de las bacterias aisladas mostraron más de cinco caracteres diferentes. En este estudio, es difícil determinar que mecanismos pueden estar involucrados principalmente en la inhibición del crecimiento *in vitro* del *V. dahliae*, ya que muchos de los aislados mostraron caracteres antagonistas diferentes. Por otra parte, otros caracteres antagonistas que pueden estar potencialmente involucrados o no se analizaron o pueden no ser inducidos bajo nuestras condiciones *in vitro*. También es importante señalar que independientemente de su actividad antagonista, varias de las especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* encontradas en la rizosfera y la endosfera del olivo son conocidas de ser activas en la solubilización de fosfato y nitrógeno (Cocking, 2003). También las cepas de *R. aquatilis* asociadas a la rizosfera de diversos cultivos tienen la capacidad de solubilizar el fosfato mineral y fijar nitrógeno, lo que implica que todas estas bacterias podrían tener efectos beneficiosos sobre el crecimiento de su planta huésped (Berge *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1997).

En conclusión, se ha presentado por primera vez la existencia de una alta diversidad de bacterias en la rizosfera de acebuches, que en gran medida permanecen aún ocultas e inexploradas, que representan un reservorio único de antagonistas frente *V. dahliae* ya que exhiben diversos mecanismos de potenciales de biocontrol. Las investigaciones futuras deben centrarse en aprovechar la capacidad inherente de estas bacterias para colonizar la rizosfera y la endosfera del olivo. Este hecho podría posicionar a estos antagonistas en una situación favorable como potenciales agentes de biocontrol frente *V. dahliae* u otros patógenos presentes en el suelo protegiendo el sistema radical del olivo de sus infecciones o potencialmente promoviendo el crecimiento vegetal. En general, nuestro objetivo final sería un mejor manejo de la sanidad del sistema radical del olivo apoyado por bacterias beneficiosas aisladas de reductos naturales de acebuches, lo que resultaría en la producción de

plantones de olivo protegidos con estas bacterias beneficiosas y en consecuencia en una olivicultura más sostenible.

V.6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, T.S., Ka, J.O., Lee, G.H. y Song, H.G. 2007. Revegetation of a lakeside barren area by the application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology* 45: 171-174.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25: 3389-3402.
- Álvarez, S., Soriano, M.A., Landa, B.B. y Gómez, J.A. 2007. Soil properties in organic olive groves compared with that in natural areas in a mountainous landscape in southern Spain. *Soil Use Manag* 23: 404-416.
- Angiolillo, A; Mencuccini, M. y Baldoni, L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 411-421.
- Baldoni, L., Cultrera, N.G., Mariotti, R., Ricciolini, C., Arcioni S, *et al.* 2009. A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol Breed* 24: 213-231.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldón, L., Porceddu, S., Barranco, D. y Satovic, Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann Bot* 100: 449-458.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Satovic, Z. y Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Sci Hort* 124: 323-330.
- Belaj, A., Z. Satovic, L. Rallo, I. y Trujillo, L. 2002. Genetic diversity and relationship in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 638-644.
- Berg, G. y Hallmann, J. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TT (ed) *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag Berlin, pgs 53-69.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. y Hallmann, J. 2005a. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 215-219.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, H., Götz, M., Costa, R. y Smalla, K. 2005b. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus

- Verticillium differs depending on plant species and site. FEMS Microbiology Ecology 56: 250-261.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Ebert, L., Zock, A. y Smalla, K. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 3328-3338.
- Berge, O., Heulin, T., Achouak, W., Richard, C., Bally, R. y Balandreau, J. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. Canadian Journal of Microbiology 37: 195-203.
- Besnard, A. y Bervillé, A. 2000. Multiple origins for the Mediterranean olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. C R Acad Sci Paris Sér III 323: 173-181.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P. y Bervillé, A. 2002. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. Theoretical and Applied Genetics 104: 1353–1361.
- Breton, C., Pinatel, C., Medail, F., Bonhomme, F. 2008. Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. Plant Sci 175: 524-532.
- Bronzini, V., Giannettini, J., Gambotti, C. y Maury, J. 2002. Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. Euphytica 123: 263-271.
- Calvo, J., Calvente, V; de Orellano, M.E., Benuzzio D. y Sanz de Tosetti, M.I. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. International of Food Microbiology 113: 251-257 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.003.
- CAP-JA. 2009. El olivar Andaluz. Consejería de Agricultura y Pesca (ed.). Servicio de Publicaciones y Divulgación: Sevilla, España.
- Chen, F., Jin-Yum, L., Yan-Bin, G., Jian-Hui, W. y Hui-Min, W. 2009. Biological control of grapevine crown gall: Purification and partial characterization of an antibacterial substance produced by *Rahnella aquatilis* strain HX2. European Journal of Plant Pathology 124: 427-437.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. y Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology 61: 1720-1726.

- Cipriani, G., Marrazo, M.T., Marconi, R., Cimato, A. y Testolin, R. 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 223-228.
- Cocking, C.E. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil* 252: 169-175.
- Colella, C., Miacola, C., Amenduni, M., D'Amico, M., Bubici, G. y Cirulli, M. 2008. Sources of *Verticillium* wilt resistance in wild olive germplasma from Mediterranean region. *Plant Pathol* 57: 533-539.
- Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola M, *et al.* 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root diseases. *Proc Natl Acad Sci* 92: 197-201.
- Correa, O.S., Montecchia, M.S., Berti, M.F., Ferrari, M.C.F., Pucheu, N.L., Kerber, N.L. y García, A.F. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41: 185-194.
- Debode, J., De Maeyer, K., Perneel, M., Pannecouque, J., De Backer, G. y Höfte, M. 2007. Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium* microesclerotia by *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1184-1196.
- De la Rosa, R., James, C. y Tobutt, K.R. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes* 2: 265–267.
- Donate-Correa, J., León-Barrios, M. y Pérez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chameacytisus proliferus* (tagasate), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil* 266: 261-272.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O. y Kuske, C.R. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl Environ Microbiol* 66: 2943–2950.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O. y Kuske, C.R., 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 190-197.

- Faltin, F., Lottman, J., Grosch, R. y Berg, G. 2004. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoactonia solani* Kühn. *Can J Microbiol* 50: 811-820.
- Garveba, P., van Veen, J.A. y van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Ann Rev Phytopathol* 42: 243-270.
- Germida, J.J., Steven, D., Siciliano, J., de Freitas, R. y Seib, A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26: 46-50.
- Green, P.S. 2002. A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin* 57: 91-140.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L. y Sessitsch, A. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol* 70: 5057-5065.
- Hernesmaa, A., Björklöf, K., Kiikkilä, O., Fritze, H., Haahtela, K. y Romantschuk, M. 2005. Structure and function of microbial communities in the rhizosphere of Scots pine after tree-felling. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 777-785.
- Issaoui, M., Mechri, B., Echbili, A., Dabbou, S., Yanghi, A., Belguit, H., Trigui, A. y Hammami, M. 2008. Chemometric characterization of five Tunisian varieties of *Olea europaea* L. olive fruit according to different maturation indices. *Journal of Food Lipids* 15: 277-296.
- Jafrá, S., Przysowa, J., Gwizdek-Wisniewska, A. y van der Wolf, J.M. 2009. Potential of bulb-associated bacteria for biocontrol of hyacinth soft rot caused by *Dickeya zeae*. *Journal of Applied Microbiology* 106: 268-277.
- Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Jiménez-Gasco, M.M., Landa, B.B. y Navas-Cortés, J.A. 2010. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in Andalusia and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* doi: 10.1094/PHYTO-07-10-0176.
- Jiménez Díaz, R.M., Tjamos, E.C. y Cirulli, M. 1998. *Verticillium* wilt of major tree hosts: olive. En: Hiemstra, J.A. y Harris, D.C. (eds.). *A Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species*. Posen y Looijen. Wageningen, Holanda, pgs. 13-16.
- Jung, S., Park, S., Kim, D. y Kim, S.B. 2008. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial community profiles in the rhizosphere of *cry1AC*-carrying *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. *The Journal of Microbiology* 46: 12-15.

- King, E.O., Ward, M.K. y Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Kim, K.Y., Jordan, D. y Krishnan, H.B. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere can solubilize hidroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* 153: 273-277.
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Raaijmakers, J.M., McSpadden-Gardener, B.B., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2002. Differential ability of genotypes of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl Environ Microbiol* 68: 3226-3237.
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., Allende-Molar, R. y Weller, D.M. 2006. Enrichment and genotypic diversity of pHID-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 351-368.
- Landa, B.B., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F.J. y Jiménez-Díaz, R.M. 2007. Phylogenetic analysis of Downy mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in-plant and seed detection of *Peronospora arborescens*. *Phytopathology* 97: 1380-1390.
- Lumaret, R. y Ouazzani, N. 2001. Ancient wild olives in Mediterranean forests. *Nature* 413: 700.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F. y Di Giusto, F. 2004. Allozyme variation of oleaster populations wild olive tree *Olea europaea* L. in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92: 343-351.
- Marilley, L. y Arango, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perene* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology* 13: 127-136.
- Marschner, P., Crowley, D. y Yang, C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261: 199-208.
- Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A., Araujo, W.I. y Raijmakers, J.M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7259-7267.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P. y Colón-Carmona, A. 2009. Influence of Arabidopsis thaliana accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Exp Bot* 60: 1729-1742.

- Muleta, D., Assefa, F., Granhall, U. 2007. In vitro antagonism of rhizobacteria isolated from *Coffea arabica* L. against emerging fungal coffee pathogens. *Eng Life Sci* 7: 577-586.
- Muleta, D., Assefa, F., Hjort, K., Roos, S. y Granhall, U. 2009. Characterization of rhizobacteria isolated from wild *Coffea arabica* L. *Engineering in Life Science* 9: 100-108.
- Navas-Cortés, J.A., Landa, B.B., Mercado-Blanco, J., Trapero-Casas, J.L., Rodríguez-Jurado, D. y Jiménez-Díaz, R.M. 2008. Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology* 98: 167-180.
- Park, M.S., Jung, S.R., Lee, M.S., Kim, K.O., Do, J.O., Lee, K.H., Kim, S.B. y Bae, K.S. 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *Journal of Microbiology* 43: 219-227.
- Paulin, M.M., Novinscak, A., St-Arnaud, M., Goyer, C., DeCoste, N.J., Privé, J.P., Owen, J. y Fillion, M. 2009. Transcriptional activity of antifungal metabolite-encoding genes *phlD* and *hcnBC* in *Pseudomonas* spp. using qRT-PCR. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 212-222.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. y Sa, T. 2006. Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown chinese cabbage *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. *Plant Soil* 286: 167-180.
- Raaijmakers, J.M. y Weller, D.M. 2001. Exploiting genotyping diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2545-2554.
- Rosenblueth, M. y Martínez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *MPMI* 19: 827-837.
- Rubio de Casas, R., Balaguer, L., Manrique, E., Pérez-Corona, M.E. y Vargas, P. 2002. On the historical presence of the wild olives *Olea europaea* L. var. *sylevestris* (Miller) Leh. In the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Anales de Jardín Botánico* 59: 342-344.
- Rubio de Casas, R., Besnard G., Schönswetter, P., Balaguer, L. y Vargas, P. 2006. Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 575-583.

- Rumberger, A., Merwin, I.A. y Thies, J.E. 2007. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at replant disease site. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1645-1654.
- Sawar, M. y Kremer, R.J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology* 20: 282-285.
- Schwyn, B. y Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Annal Biochem* 160: 47-56.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendoca, D., Dos Santos, M.R., Da Camara Machado, M.L. y Da Camara Machado, A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* 9: 1171-1193.
- Shannon, C.E. y Weaver, W. 1963. *The mathematical theory of communication*, University of Illinois Press, Urbana.
- Silva, A.H.S., da Silva Romeiro, R., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B., Pereira, M.C. y Mounteer, A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* 29: 288-295.
- Uppal, A.K., El Hadrami, A., Adam, L.R., Tenuata, M. y Daayf, F. 2008. Biological control of potato *Verticillium* wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. *Biological Control* 44: 90-100.
- Vargas, P. y Kadereit, J.W. 2001. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, inter-simple sequence repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Flora* 196: 142-152.
- Vassilev, N., Vassileva, M. y Nikolaeva, I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potential and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 137-144.
- Wang, Y., Li, Q., Shi, J., Lin, Q., Chen, X., Wu, W. y Chen, W. 2008. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a cooper accumulator and a non-accumulator. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1167-1177.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, J.D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L. y de la Fuente L, et al 2007. Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in plant defense. *Plant Biology* 9: 4-20.

Zohary, D. y Hopf, M. 1994. Domestication of plants in the Old World, 2nd edn. Oxford, UK: Clarendon Press.

Zohary, D. y Spiegel-Roy, P. 1975. Beginning of fruit growing in the old world. Science 187: 319-327.

CAPÍTULO VI

VI

Nuevas bacterias de pigmentación morada productoras de violaceína pertenecientes al género *Duganella* con interés biotecnológico aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado

En este capítulo se recogen los resultados relativos al objetivo cuarto de esta Tesis Doctoral, en el cual se pretendía:

Aislar, identificar y caracterizar aislados bacterianos a partir de la rizosfera de olivo silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y olivo cultivado (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) con interés para diversas aplicaciones biotecnológicas.

VI.1. RESUMEN

Las bacterias del suelo y la rizosfera han desarrollado funciones para sobrevivir que les permiten soportar la fuerte competición que caracteriza la mayoría de estos hábitats. Mediante análisis microbiológico y fisiológico clásicos y análisis molecular, aislamos e identificamos por primera vez en medio ambientes de clima Mediterráneos especies de *Duganella* asociadas con la rizosfera de plantas leñosas, concretamente olivo, que son capaces de producir violaceína, un metabolito secundario de color azul-morado de alto interés biotecnológico. Basado en la caracterización fisiológica y bioquímica, el análisis filogenético de tres genes incluyendo 16S ADNr, *gyrB* y *vioA* (implicado en la síntesis de violaceína), las siete cepas de *Duganella* spp. pudieron ser diferenciadas de acuerdo a su huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado). Todas las cepas de *Duganella* spp. produjeron violaceína *in vitro*, con niveles de producción natural más altos (hasta X65) que los citados en la literatura para cepas de otras especies bacterianas productoras de violaceína, aún cuando en esta Tesis Doctoral no se intentó optimizar las condiciones de cultivo para la producción de este compuesto. Las importantes aplicaciones biológicas, médicas, e industriales de la violaceína hacen de estas bacterias buenas candidatas para su explotación biotecnológica, ya que los bajos rendimientos en la producción de violaceína se consideran una de las principales limitaciones de las cepas silvestres para su producción masiva y explotación comercial. Independientemente de la producción de violaceína, también observamos que las cepas con pigmento morado provenientes de olivo mostraron actividad proteolítica y lipolítica y una débil producción de sideróforos. No se demostró actividad inhibidora *in vitro* frente bacterias gram-negativas y hongos fitopatógenos, pero si contra bacterias gram-positivas, ni de las cepas de *Duganella* spp. ni de sus filtrados crudos conteniendo violaceína. En este estudio, la significación ecológica de la asociación a largo plazo entre estas *Duganella* spp. con olivos centenarios silvestres y cultivados y

las comunidades microbianas autóctonas asociadas a su rizosfera es discutido.

VI.2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las interacciones planta-microorganismo que ocurren en la rizosfera han sido objeto de considerables estudios, ya que la rizosfera se considera un potencial reservorio para el descubrimiento de especies microbianas de diverso interés biotecnológico (Ryan *et al.*, 2009; Weisskopf *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2004). De hecho, los microorganismos del suelo y la rizosfera han evolucionado funciones que les permiten sobrevivir y poder soportar la fuerte competencia que caracteriza la mayoría de esos hábitats. Las bacterias de la rizosfera pueden producir metabolitos secundarios novedosos con potencial uso como fármacos y antibióticos, los cuales pueden tener aplicación en medicina humana y veterinaria, agricultura o industria. En este contexto, las moléculas pigmentadas producidas por bacterias han sido objeto de considerables investigaciones (Margalith, 1992).

Numerosas investigaciones centradas en el estudio de pigmentos microbianos han ayudado a revelar como esas moléculas pueden proveer a ciertos microorganismos una ventaja para sobrevivir en su medio ambiente (Liu y Nizet, 2009). Entre estos pigmentos se encuentra la violaceína, un metabolito secundario con coloración azul-morada producido por bacterias, y que ha sido objeto de diferentes estudios debido a sus importantes aplicaciones biológicas, biotecnológicas e industriales. La violaceína se ha demostrado que es producida por varias bacterias gram-negativas que habitan suelos y mares en medio ambientes tropicales, subtropicales y glaciares entre las que se incluyen *Chromobacterium violaceum*, la primera y más estudiada bacteria descrita como productora de violaceína (Dessaux *et al.*, 2004; Durán y Menck, 2001; Ruhul-Momen y Hoshino, 2000), *Collimonas* sp. (Hakvåg *et al.*, 2009), una nueva *Duganella*

sp. (Wang *et al.*, 2009), *Lodobacter fluviatile* (Logan, 1989), *Janthinobacterium lividum* (Lu *et al.*, 2009; Matz *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Shivaji *et al.*, 1991), *Microbulbifer* sp. (Matz *et al.*, 2008), *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *P. tunicata* y *P. ulvae* (MacCarthy *et al.*, 1985; Matz *et al.*, 2004; 2008; Yang *et al.*, 2007).

La violaceína tiene diversas actividades biológicas incluyendo actividad antibacteriana (Durán *et al.*, 1983; Durán y Menck, 2001), antiviral, (Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2003; Balibar y Walsh, 2006), anti-tripanicida (Durán *et al.*, 1994; Riveros *et al.*, 1988;), anti-protozoa (Matz *et al.*, 2004), y anti-ulcerogénica (De Carvalho *et al.*, 2006). Además, puede tener una prometedora aplicación clínica en el tratamiento del cáncer ya que es efectivo contra leucemia, cáncer pulmonar y linfoma celular (De Azevedo *et al.*, 2000; Durán *et al.*, 2007). Adicionalmente, la violaceína puede ser usada en terapias dermatológicas contra la radiación ultravioleta (Caldas *et al.*, 1978; Dessaux *et al.*, 2004), y como tinte biológico en la industria para la tinción de fibras naturales y sintéticas (Shirata *et al.*, 2000).

La rizosfera de árboles leñosos silvestres perennes, es un medio ambiente inexplorado que puede constituir una buena fuente de nuevas bacterias productoras de compuestos bioactivos. Entre los árboles silvestres y cultivados, el olivo es una de las especies de mayor longevidad y de mayor riqueza en biodiversidad genética. Por miles de años, el olivo cultivado ha sido culturalmente y económicamente el principal cultivo oleaginoso en la cuenca del Mediterráneo, donde se encuentran cerca de 9.5 millones de ha de cultivo (Angiolillo *et al.*, 1999; Bronzini *et al.*, 2002; Issaoui *et al.*, 2008; Sefc *et al.*, 2000). El olivo contiene una alta fuente de variabilidad genética, y en la cuenca del Mediterráneo se puede encontrar principalmente en dos formas: olivo silvestre (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) y olivo cultivado (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) (Green, 2002). España es el mayor productor de aceite de oliva en el mundo, y Andalucía, la región en el extremo sur del país, es la principal área de cultivo del olivo (IOOC, 2009). La larga historia

del cultivo del olivo (más de 8.000 años) (Zohary y Spiegel-Roy, 1975) y la amplia hibridación entre árboles silvestres y cultivados hacen del occidente Mediterráneo, y fundamentalmente del sur de la Península Ibérica y el Magreb (Besnard *et al.*, 2002) la región con mayor diversidad genética para este árbol (Lumaret *et al.*, 2004; Lumaret y Ouazzani 2001). Actualmente, Andalucía es un punto de alta diversidad genética de olivo donde algunas poblaciones auténticas de olivo silvestre probablemente han sobrevivido *in situ* a través de las diversas glaciaciones en medio ambientes riparios restringidos (Terral *et al.*, 2004).

En esta Tesis Doctoral nuestra hipótesis de trabajo fue que la longevidad y alta diversidad genética del olivo puede favorecer la selección de poblaciones microbianas específicas y bien adaptadas a la rizosfera de este cultivo que pueden constituir reservorios únicos de microorganismos con interés biotecnológico. Durante un estudio sobre olivo silvestre en Andalucía, sur de España, con el propósito de estudiar y aislar bacterias de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado con potencial antagonista contra *Verticillium dahliae*, agente causal de la Verticiliosis del olivo, que es considerada la principal enfermedad fúngica de suelo de este cultivo en todo el mundo, se aislaron bacterias con una pigmentación morada característica (Fig. VI.1.A). El principal objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar mediante un análisis polifásico (Fig. VI.1), siete cepas de estas bacterias y determinar si el compuesto violaceína es el responsable de la coloración característica de sus colonias. De acuerdo a nuestra información hasta la fecha, este estudio representa la primera cita de bacterias con pigmentación morada productoras de violaceína asociadas a árboles leñosos y específicamente habitando la rizosfera de olivo silvestre y cultivado.

VI.3. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.3.1. Aislamiento, y condiciones de cultivo de las cepas con pigmentación morada

Las raíces de olivo de 92 fincas comerciales localizadas en las principales áreas olivareras de las provincias de Córdoba, Jaén, Sevilla y Granada y de 11 zonas con olivos silvestres localizados en el área potencial donde se pueden localizar tanto acebuches verdaderos (i.e., formas silvestres en áreas naturales) como formas asilvestradas (i.e., derivados sexuales secundarios de clones cultivados o productos de hibridación entre árboles cultivados y acebuches cercanos) (Lumaret *et al.*, 2004), localizados en las provincias de Córdoba y Cádiz, fueron muestreados en Andalucía, sur de España en la primavera del 2009 (Tabla VI.1). Las suspensiones bacterianas obtenidas de la rizosfera fueron diluidas en serie y sembradas en medio R2A (Biolofer, Milan, Italia) e incubadas a $28\pm 1^\circ\text{C}$ por 72h en oscuridad.

Después del periodo de incubación, se observó la aparición de colonias bacterianas con pigmentación morada en cerca del 10% de las muestras (Fig. VI.1.A) que fueron purificadas para su posterior caracterización fisiológica, bioquímica y molecular (Fig. VI.1.B y C).

Tabla VI.1. Localización, altitud y características climáticas de los sitios de origen de las cepas de *Duganella* spp.

Cepa	Plantas olivo	Localización	Coordenadas	Alt ^a (m)	Características climáticas		
					Clasificación	°C	mm
LO-22	Silvestre, >200 años	8.0 Km SO Benalup-C. Viejas, Cádiz	36°18'43.65"N 5°54'1.14" O	53	Mediterráneo Marítimo	17-19	600-800
LOBA-24	Silvestre, >200 años	7.4 Km SO Benalup-C. Viejas, Cádiz	36°18'26.64" N 5°52'56.01" O	47	Mediterráneo Marítimo	17-19	600-800
Baetica-33	Silvestre, >200 años	1.5 km E Vejer, Cádiz	36°14'32.64" N 5°57'1.63" O	14	Mediterráneo Marítimo	17-19	1200- 1600
MICO-C MICO-M	Cultivado cv. Arbequina 5 años edad	6.03 Km S Villafranca, Córdoba	37°54'27.53"N 4°34'3.52"O	160	Mediterráneo Subtropical	15-17	400-600
MICO-M2	Cultivado cv. Arbequina 4 años edad	3.05 Km SO, Córdoba	37°51'24.54"N 4°48'5.32"O	175	Mediterráneo Subtropical	15-17	400-600
CICYT-60	Cultivado cv. Picual >100 años edad	3.2 Km SE Alcaudete, Jaén	37°36'17.65"N 4° 7'8.95"O	530	Mediterráneo Subtropical	15-17	400-600

^a Altitud por encima del nivel del mar (m).

^b Clasificación climática (J. Papadakis), temperatura media anual en °C, y precipitación anual en mm fueron obtenidos de SigMapa, Sistema de Información Geográfica del Ministerio Español del "Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino" (<http://sig.mapa.es/geoportal/>).

VI.3.2. Caracterización fisiológica y bioquímica

La prueba de oxidación-fermentación de la glucosa (O-F) y la habilidad de producir ácido a partir de carbohidratos y compuestos relacionados fue monitorizado por el método de Hugh y Leifson (1953). La actividad de catalasa y oxidasa fue determinada siguiendo los procedimientos descritos por Bergey (1994) (Fig. VI.1.F). La tinción de Gram fue realizada utilizando cultivos bacterianos puros de 48 h de edad. La actividad proteolítica fue evaluada utilizando el ensayo en placas con un medio semi-cuantitativo utilizando leche desnatada-agar (Chernin *et al.*, 1995), mientras que la actividad lipolítica fue evaluada utilizando el medio Tween 80-agar; ambas actividades se detectan por la presencia de halos claros y halos turbios respectivamente alrededor del crecimiento de las colonias bacterianas. La producción de sideróforos fue evaluada bajo condiciones de limitación de hierro utilizando el ensayo universal para la

producción de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987). Todas las pruebas fisiológicas y bioquímicas fueron realizadas a 28°C en condiciones de oscuridad.

El crecimiento y la producción del pigmento morado de todas las cepas bacterianas fue evaluado en diferentes medios sólidos y líquidos a 25±1°C durante 48 h en oscuridad. Los medios evaluados fueron: R2A, triptona soja (TS) agar (TSA), 1/10 caldo triptona soja (TSB) suplementado con antibióticos (Landa *et al.*, 2003, 2006), extracto de levadura malta agar (YMA), y agar nutritivo (NA). Todos los medios fueron adquiridos a 'Difco Laboratories' (Detroit, Michigan, EEUU). Adicionalmente, se evaluó el crecimiento y producción de violaceína de las siete cepas bacterianas en medio R2A a diferentes temperaturas incluyendo 4, 15, 25, 28, 30, 37 y 40 ±1°C en condiciones de oscuridad (Fig. VI.1.E).

Para el ensayo de utilización de fuentes de carbono y enzimas se utilizó el sistema de microplacas Biolog GN2 (Biolog, Barcelona, España) y el sistema APIZYM (Biomerieux, Madrid, España) (Fig. VI.1.D) y suspensiones bacterianas acuosas en 0.85% NaCl. Para las placas APIZYM, los cultivos fueron incubados a 28±1°C durante 24h. Posteriormente, las galerías fueron activadas agregando 30 µl de cada reactivo (ZYM A y ZYM B; BioMerieux), y tras un periodo de 5 min a temperatura ambiente se realizó una evaluación semi-cuantitativa de la actividad enzimática utilizando como referencia una tabla colorimétrica estándar, asignando un valor numérico de 0 a 5 (equivalente de 0 a 40 nmol) (Sciancalepore *et al.*, 1996), dependiendo de la intensidad de color del sustrato cromogénico producido por la reacción de hidrólisis (Fig. VI.1.D).

Las placas Biolog fueron incubadas durante 5 días a 28±1°C midiendo periódicamente la absorbancia a 585 nm utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Tecan Safire (Tecan España, Barcelona, España). El promedio del desarrollo de color de todos los pocillos (Average Well Colour Development) (AWCD) de cada placa fue calculado como la media de los valores de absorbancia para todas las respuestas de los pocillos por cada

tiempo de lectura. La cinética de AWCD fue usada para determinar la velocidad y el nivel asintótico de asimilación de los sustratos. Se realizó un análisis de 'cluster' o agregación en el que los dendrogramas fueron contruidos utilizando la matriz de similaridad a partir de los datos de caracterización fenotípica utilizando el coeficiente de Dice (datos binarios) o el coeficiente de correlación de Pearson (datos cuantitativos). Se utilizó el análisis UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) para el análisis de agregación con el paquete Bionumerics 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgica). La significancia de los nodos fue evaluado por análisis 'bootstrap' o de soporte sobre 1,000 aleatorizaciones.

VI.3.3. Caracterización molecular mediante análisis filogenético de los genes 16S ADNr, *gyrB* y *vioA*

El ADN de las cepas bacterianas fue aislado utilizando el kit de extracción UltraClean™ Microbial DNA kit (MoBio Laboratories, Inc., CA, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se utilizó ADN de la cepa tipo de *D. violaceinigra* CCUG 50881T (= *D. violaceinigra* YIM 31327T) en los estudios moleculares. Las cepas fueron identificadas a nivel de género/especie mediante la secuenciación de la región 16S ADNr usando los iniciadores 8f y 1492r según Landa *et al.*, (2003). El gen *gyrB* fue amplificado con los iniciadores Up-1G- y Up-2G- descritos por Mavrodi *et al.* (2010). Además, se utilizaron el par de iniciadores degenerados VPA3/VPA4 (Hakvåg *et al.*, 2009) para amplificar un segmento ~1.kb del gen *vioA* que codifica la flavoenzima *vioA*. Este gen se seleccionó debido al mayor número de secuencias disponibles en la base de datos GenBank para este gen en comparación con otros genes existentes para la síntesis de violaceína en otros géneros de bacterias. Las secuencias amplificadas fueron purificadas utilizando el kit PureLink PCR (Invitrogen, Barcelona, España). La práctica totalidad de la longitud de los genes amplificados 16S ADNr (~1.5 kb), *gyrB* (~1.kb) y *vioA* (~1.kb) fue

directamente secuenciada usando los mismos iniciadores que se utilizaron para la amplificación en las instalaciones de STABVIDA (Caparica, Portugal). Todas las secuencias de los genes estudiados fueron analizadas mediante análisis BLAST, y los fragmentos amplificados más cercanos a la secuencias de las cepas fueron extraídas y alineadas utilizando el software Bionumerics 6.1 para su análisis filogenético. Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando análisis de 'Neighbor-Joining (NJ)' del vecino más próximo. La robustez de los grupos originados fue testada mediante análisis 'bootstrap' (1,000 repeticiones). Las secuencias obtenidas en este estudio fueron depositadas en el GenBank.

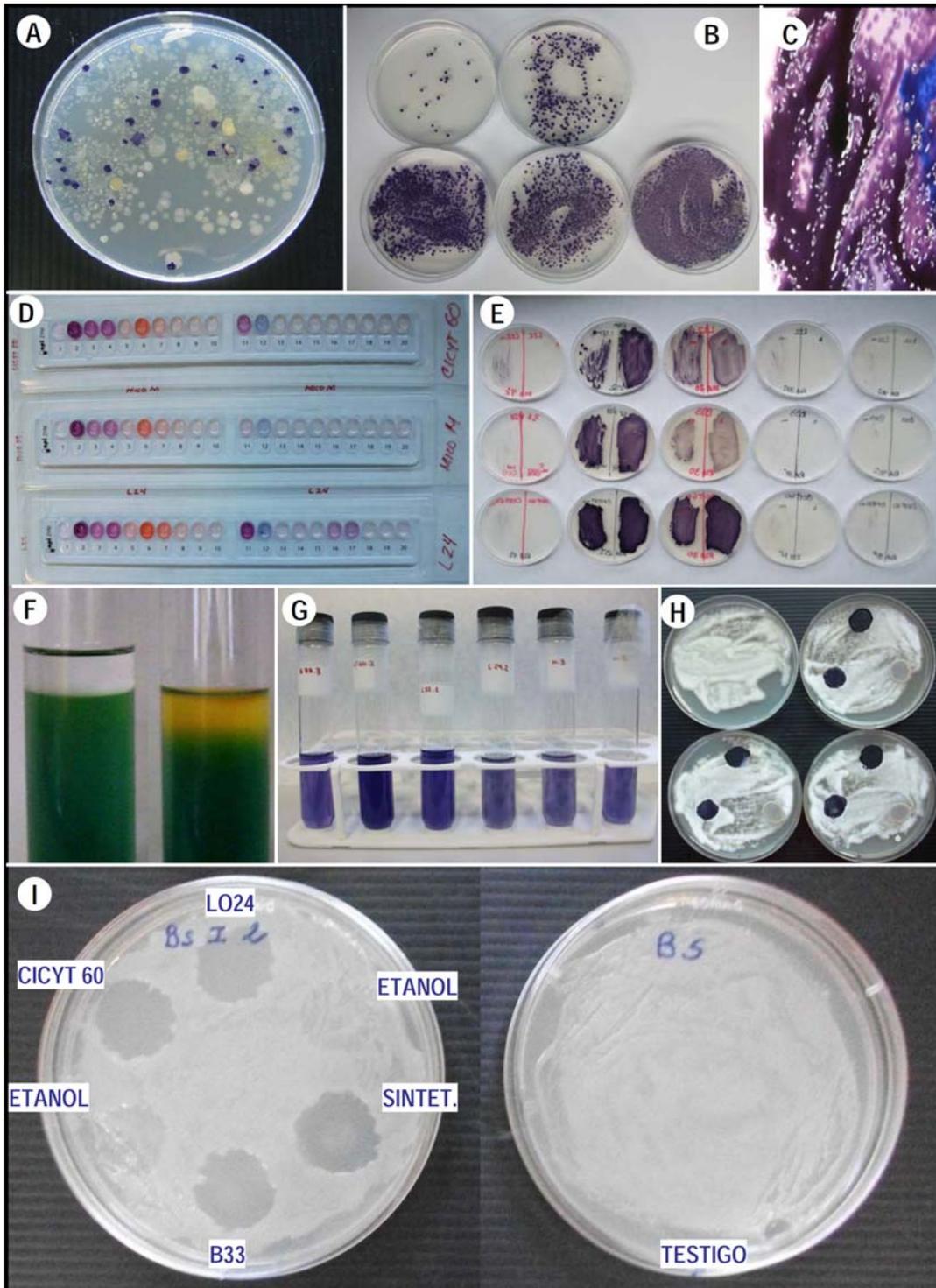


Figura VI.1. Procedimiento de aislamiento y pruebas de caracterización fisiológica de los aislados de *Duganella* spp. de olivo silvestre y cultivado, demostración de la producción de violaceína y análisis de su actividad antimicrobiana.

VI.3.4. Detección, producción y extracción de violaceína

La evaluación *in vitro* para la producción de violaceína fue realizada utilizando las condiciones y medio de cultivo óptimas descritas con anterioridad para una *Duganella* sp. (Wang *et al.*, 2009) (pH 6,7, nitrato de potasio 1,18 g/L, sulfato de amonio ferroso 0,08 g/L, fosfato dipotásico 0,25 g/L, sulfato de magnesio 0,75 g/L, extracto de carne 1,53 g/L, L-triptofano 0,74 g/L, almidón soluble 13 g/L, 25 ml del medio en matraces de 250 mL) con un tamaño de inóculo inicial del 10% (v/v) o 20% (v/v) de un cultivo bacteriano en el mismo medio en una fase de crecimiento estacionario. Los cultivos fueron incubados en un agitador rotatorio a 60 rpm y $25\pm 1^\circ\text{C}$ durante 5h (cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria). La violaceína cruda fue extraída de las células utilizando el método de extracción de etanol de acuerdo a Wang *et al.* (2009) (Fig. VI.1.G).

La producción de violaceína cruda fue medida basada en la absorbancia de la solución de etanol a 585 nm utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Metertek SP-850; Metertech Inc., Taipei, Taiwan) (Mendes *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007). Además, la violaceína cruda obtenida por el proceso de extracción anteriormente descrito fue separada y purificada mediante cromatografía líquida de alta resolución, en un sistema HPLC Agilent 1200 equipado con un detector de diodos (DAD) (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con una columna de octadecilsilano (ODS) (Tracer Excel 120 ODS-B, 5 mm, 250 x 46 mm), para medir la composición y compararlo con la violaceína comercial obtenida de *J. lividum* (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y con datos previamente publicados (Jiang *et al.*, 2010; Retori y Durán, 1998; Sánchez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). La longitud de onda de medida fue de 570 nm y la fase móvil consistió en metanol 70% a un porcentaje de flujo de 1 mL/min a una temperatura de 30°C (Jiang *et al.*, 2010).

Las diferencias en la producción de violaceína cruda fueron analizadas por análisis de varianza estándar y la comparación de medias entre tratamientos mediante el contraste protegido de Fisher de las

Mínimas Diferencias Significativas ($P = 0,05$) utilizando el programa STATISTIX 9.0 (Analytical Software, St. Paul, MN, EE.UU.).

VI.3.5 Actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*

La actividad antibacteriana y antifúngica de las cepas se determinó mediante ensayos en cultivo-duales *in vitro* utilizando el medio Waksman agar (Berg *et al.*, 2002) frente cinco cepas de bacterias fitopatógenas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), una cepa de *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de olivo, y cinco hongos fitopatógenos del suelo (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora megasperma*, *P. inundata* y *V. dahliae*; los últimos tres hongos son patógenos de olivo y han sido aislados de las raíces de esta planta) (Fig. VI.1.H). Las suspensiones bacterianas y de conidias (solamente para *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* y *V. dahliae*) se ajustaron hasta alcanzar una concentración aproximada de 1×10^8 y 5×10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) respectivamente, y fueron utilizadas para inocular completamente la superficie del medio Waksman agar contenido en placas petri de 9 cm de diámetro. Asimismo, para todos los hongos evaluados se obtuvieron discos de 0.5-cm de medio de cultivo con micelio fúngico tomando una porción de los márgenes de una colonia con crecimiento micelial activo que se colocaron en el centro de las placas con el medio Waksman agar. Se inocularon discos de papel filtro con 30 μ l de cada cepa bacteriana creciendo en el medio de cultivo óptimo para la producción de violaceína (Wang *et al.*, 2009) y fueron colocadas sobre las placas a 1 cm de distancia del borde de la placa. Por otra parte, los filtrados de violaceína cruda (10 μ l) provenientes de las seis cepas bacterianas seleccionadas y una solución de violaceína comercial (50 μ M) en etanol fueron inoculados sobre el medio Waksman agar que previamente se habían inoculado con

las bacterias y los hongos de la misma forma anteriormente descrita. Como control se utilizó etanol (Fig. VI.1.I). Se realizaron tres repeticiones por cepa bacteriana. Las placas fueron incubadas a 25°C y se realizó una evaluación cualitativa de la inhibición basada en la presencia/ausencia de halos de inhibición alrededor del punto de inoculación.

VI.4. RESULTADOS

VI.4.1 Aislamiento de las cepas con pigmentación morada

Bacterias con pigmentación morada (Fig. VI.1.A) fueron identificadas en 27,3% de las muestras de las raíces tomadas de olivos silvestres en la provincia de Cádiz, y únicamente en 4,4% de las muestras de raíces de 92 fincas comerciales de olivo muestreados en toda Andalucía. Es de destacar que a pesar de que ocho cultivares diferentes fueron muestreados en las fincas comerciales, las bacterias con pigmentación morada fueron aisladas únicamente de los cvs. Arbequina y Picual (Tabla VI.1).

Siete cepas de las bacterias pigmentadas que hipotéticamente podrían ser productoras de violaceína fueron seleccionadas para estudios posteriores (Tabla VI.1). De éstas, tres cepas (Baetica-33, LO22 y LOBA-24) provinieron de la rizosfera de acebuches centenarios (edad mayor de 200 años basados en el diámetro del tronco; Michelakis, 2002) localizados en diferentes áreas geográficas; dos cepas (MICO-C, MICO-M) provinieron de la misma finca comercial a partir de la rizosfera de olivos del cv. Arbequina con una edad de 5 años inoculados (MICO-M) o no (MICO-C) con un producto comercial a base de micorrizas (Mycosim-TRI-TON, MYCOSIM International AG, Basel Suiza) durante su fase de producción en vivero; la cepa MICO-M2 provino de un campo comercial diferente a partir de la rizosfera de olivos del cv. Arbequina de 4 años de edad inoculados con el mismo inóculo micorrízico; y la cepa CICYT-60 provino de una finca comercial con olivos centenarios del cv. Picual (>100 años de edad).

VI.4.2. Caracterización molecular mediante análisis filogenético de los genes 16S ADNr y *gyrB*

El análisis de la práctica totalidad de la longitud de las secuencias del 16S ADNr de todas las cepas mostraron que éstas están estrechamente relacionadas entre ellas (>99.3% similaridad de las secuencias), y pudieron ser asignadas a la clase β -Proteobacteria, orden '*Burkholderiales*,' familia '*Oxalobacteraceae*,' con el género más cercano *Duganella*. Basado en la homología de los genes 16S ADNr de las bacterias se construyó el árbol filogenético mediante análisis de Neighbor Joining (NJ) conteniendo la secuencia del gen 16S de las siete cepas bacterianas obtenidas de olivo, las cepas de referencia de *Duganella* spp. y *Janthinobacterium lividum* y varias secuencias relacionadas de organismos no cultivables contenidas en clones procedentes de la base de datos del GenBank (Fig. VI.2). El análisis filogenético del gen 16S ADNr indicó que las siete cepas con pigmentación morada fueron identificadas como *Duganella* spp. Hasta donde sabemos, esta es la primera cita de *Duganella* spp. en la rizosfera de plantas leñosas y como habitante específico de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados. Todas la secuencias 16S ADNr de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados mostraron una homología más baja (95,5-96,0%) con respecto a la de la especie tipo de *Duganella* (*D. zoogleoides*) y del aislado de *Duganella* sp. B2, la primera *Duganella* sp. productora de violaceína citada hasta el momento (Wang *et al.*, 2009). Es de destacar que a pesar de que la cepa B2 ha sido citada como una *Duganella* sp. (Jiang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009), en nuestro estudio, los análisis filogenéticos mostraron que está más estrechamente relacionada a *J. lividum* debido a que su secuencia 16S ADNr se agrupó con *Duganella* sp. tsz33 (una cepa aislada de un Glaciar en China) y como un grupo hermano de todas las secuencias de *J. lividum* del GenBank (58% de soporte) (Fig. VI.2).

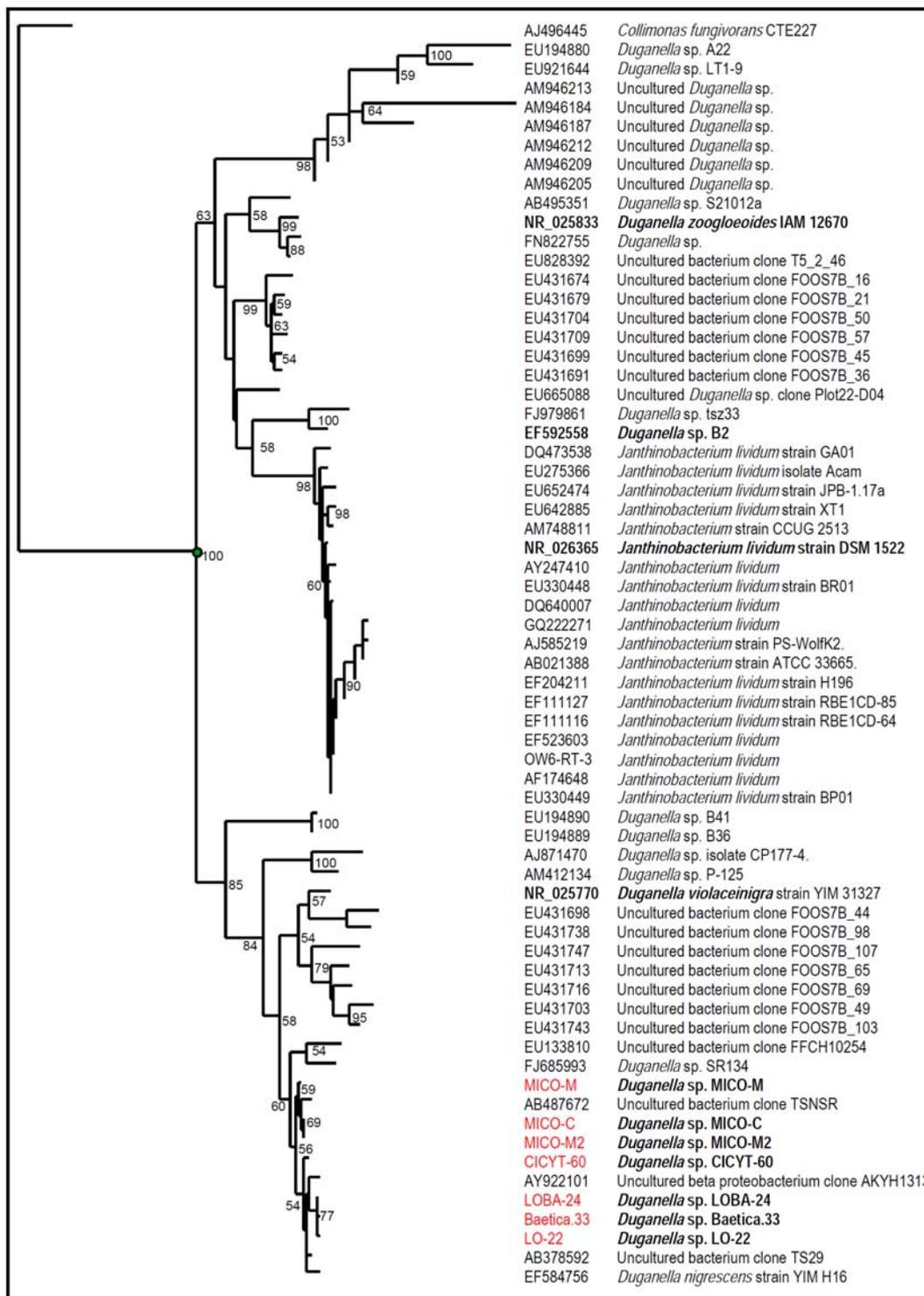


Figura VI.2. Relación filogenética (Neighbor-Joining) de las secuencias 16S ADNr de las cepas de *Duganella* spp. de olivo silvestre y cultivado con otras bacterias productoras de violaceína. Las secuencias de ADN más cercanas del gen 16S ADNr en el GenBank fueron utilizadas para comparación. Las cepas en negrita han sido caracterizadas en este estudio, son cepas tipo o referidas específicamente en el texto del manuscrito. La secuencia AJ496445 de *Collimonas fungivorans* CTE227 fue usada como grupo externo. Los números son números de acceso en la base de datos del GenBank. Solo se indican los valores 'Bootstrap' mayores de 50% en los nodos de los agrupamientos principales.

Por el contrario, la secuencia de los genes 16S ADNr de las cepas de olivo silvestre y cultivado mostraron una homología del 98,6-99,3% con la cepa tipo de *D. violaceinigra* YIM 31327 y se agruparon con otras cepas y secuencias de organismos no cultivados en un cluster hermano diferente al de la especie tipo (58% de soporte). A pesar de que las siete cepas de olivo mostraron alta homología en la secuencia 16S ADNr (99,4-100%), tres subgrupos pudieron ser diferenciados entre ellos de acuerdo a su huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado); con la cepa CICYT-60 mostrando una posición intermedia.

El análisis filogenético del gen *gyrB* usando un set de datos menor mostró resultados similares a los obtenidos con el gen 16S ADNr, con la cepa *Duganella* sp. B2 siendo genéticamente diferente de la cepa tipo de *D. violaceinigra* YIM 31327 y de las cepas de olivo (99% de soporte), las cuales se agruparon nuevamente de acuerdo a su origen (Fig. VI.3A). Así, las tres cepas de olivo silvestre se agruparon como un grupo basal de la cepa tipo *D. violaceinigra* YIM 31327 (54% de soporte; 93,9-94,8% de similaridad) y todas estas cepas formaron un grupo hermano de las cuatro provenientes de olivo cultivado (100% de soporte) (Fig. VI.2A).

VI.4.3. Caracterización fisiológica y bioquímica, y condiciones de cultivo óptimas

Todas las cepas bacterianas crecieron mejor y produjeron pigmento morado a 25°C en comparación con las temperaturas de 15, 20, 28, 30, y 34°C (Fig. VI.1.E); sin embargo, ninguna de las cepas creció a 40°C después de cinco días de incubación en medio R2A. Las cepas MICO-M, MICO-M2, y CICYT-60 fueron capaces de crecer a 4 y 37°C, pero no fue evidente la producción del pigmento morado (Tabla VI.S1 suplementaria).

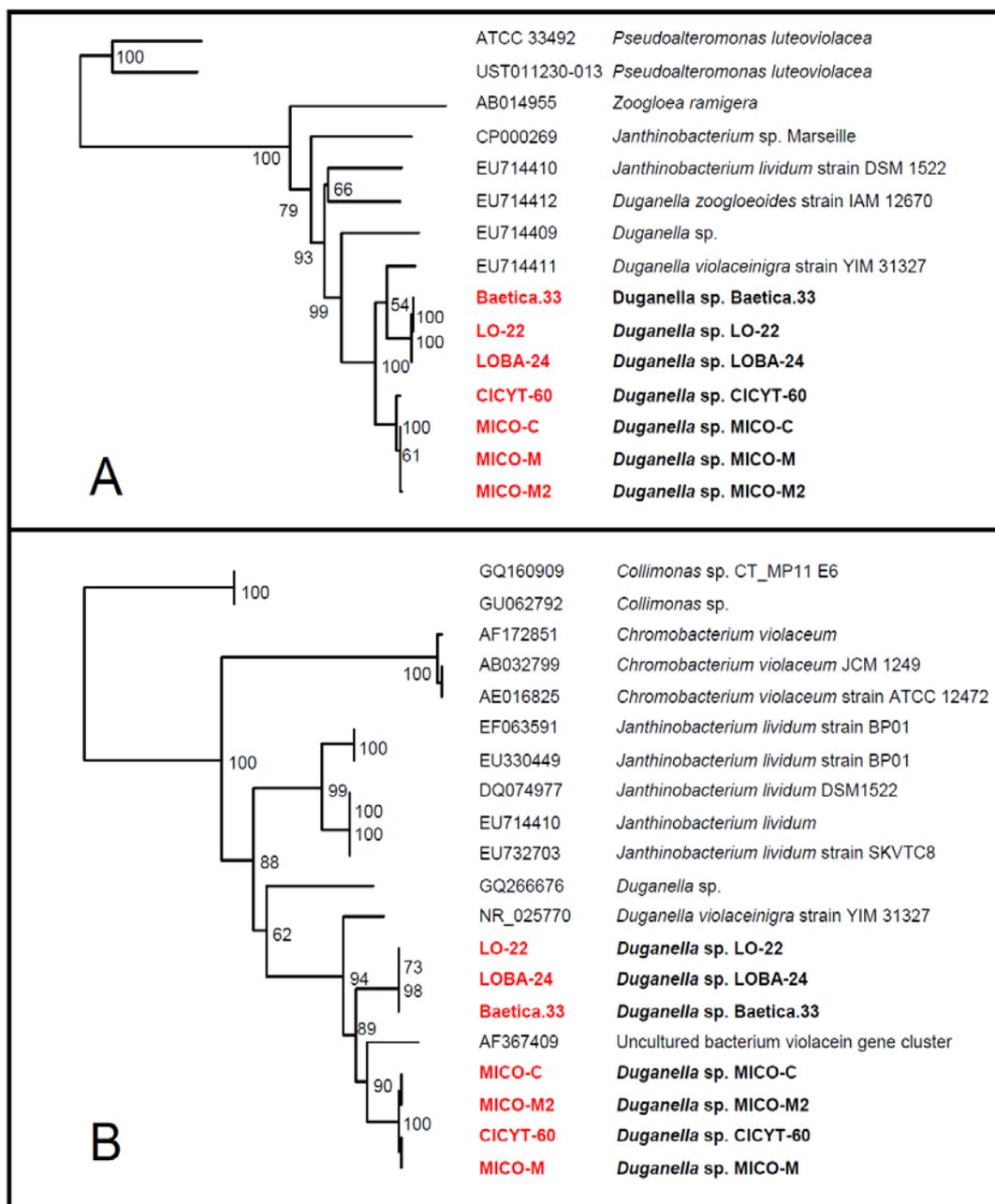


Figura VI.3. Relación filogenética (Neighbor-Joining) de las secuencias de los genes *gyrB* (A) y *vioA* (B) de las cepas de *Duganella* spp. de olivo silvestre y cultivado con otras bacterias productoras de violaceína. Las secuencias de ADN de ambos genes disponibles en el GenBank fueron usadas para comparación. Las secuencias del gen *gyrB* de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (A) y *vioA* de *Collimonas* sp. (B) fueron usadas como grupo externo. Solo se indican los valores 'Bootstrap' mayores de 50% en los nodos de los agrupamientos principales.

Cuando se evaluaron diferentes medios de cultivo a una temperatura de incubación de 25°C, el mejor crecimiento ocurrió en el medio R2A donde todas las cepas mostraron una fuerte producción del pigmento morado después de 48h de incubación, seguido por los medios TSA y 1/3x KMB con y sin antibióticos (Tabla VI.2). Sin embargo, lo opuesto ocurrió en el medio YMA y NA donde se observó un pobre crecimiento y muy escasa producción del pigmento morado bajo las mismas condiciones de incubación (Tabla VI.2). Adicionalmente, todas nuestras cepas fueron capaces de crecer en medio líquido 1/3x KMB⁺⁺⁺ suplementado con los antibióticos ampicilina, cloranfenicol y cicloheximida y en 1/10x TSB⁺ suplementado con cicloheximida. Además se observó que el cultivo continuado de las cepas, principalmente en medio TSA y 1/3x KMB, ocasiona en ellas que el pigmento morado no se produzca en forma consistente. La cepa MICO-C mostró un crecimiento y producción del pigmento morado inestable después del crecimiento continuado en todos los medios y fue descartada para los estudios sucesivos.

Las cepas de olivo silvestre y cultivado fueron gram-negativas, no fermentativas (catabolizaron la glucosa en forma oxidativa en la prueba O-F; Fig. VI.1.F), catalasa +, oxidasa +, y la mayoría de ellos mostraron actividad proteolítica y lipolítica. Además, todas las cepas mostraron una débil producción de sideróforos (Tabla VI.2). La mayoría de las cepas produjeron ácido a partir de galactosa, pero en general, no lo hicieron cuando se utilizaron otras fuentes de carbono (Tabla VI.2). Nuestras cepas difirieron en muchas características con respecto a la especie tipo de *Duganella* (*D. zoogleoides*) (Hiraishi *et al.*, 1997) y en algunas características de *D. violaceinigra* (Li *et al.*, 2004) (Tabla VI.2) principalmente en la producción de ácido a partir de glucosa en forma oxidativa y en la actividad oxidasa. También todas las cepas difirieron de *D. violaceinigra* en al menos dos de las cinco actividades enzimáticas determinadas por el sistema API comparadas con las citadas en Li *et al.* (2004) (Fig. VI.1.D).

Tabla VI.2. Características fenotípicas diferenciales de las cepas de *Duganella* spp. aisladas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados y de dos *Duganella* spp. descritas

Característica ^a	Olivos silvestres					Olivos cultivados					Cepas de referencia ^b	
	LO-22	LOBA-24	Baetica-33	Mico-C	Mico-M	Mico-M2	CICYT-60	YIM 31327 ^T	IAM 12670 ^T			
Reacción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción oxidativa de ácido de glucosa (O/F test)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Actividad proteolítica	+	+	+	+	+	-	+	nr	nr	nr	nr	nr
Actividad lipolítica en Tween 80	+	+	+	-	-	-	-	nr	nr	nr	nr	nr
Producción de sideróforos	±	±	±	±	±	±	±	nr	nr	nr	nr	nr
Pigmentación de colonias	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Violeta-negro	Violeta-negro	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Producción de ácido de:												
L(+) arabinosa	-	-	-	+	+	+	+	nr	nr	nr	nr	nr
D(+) glucosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D(+) galactosa	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D(+) trehalosa	-	+	-	-	-	-	+	nr	nr	nr	nr	nr
L(-) sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	nr	nr	nr	nr	nr
α-D-metil glucósido	-	-	-	-	-	-	-	nr	nr	nr	nr	nr
Maltosa	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D (-) manitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr	nr	nr	nr
meso- inositol	-	-	-	-	-	-	-	nr	nr	nr	nr	nr
Crecimiento/Producción de color morado en medio de cultivo (25°C):												
R2A	+++	+++	+++	±	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
1/3x King's B agar (1/3x KMB)	+++	+++	+++	±	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
1/3x KMB ⁺⁺⁺ agar	++/±	++/±	++/±	±	++/±	++/±	++/±	+	+	+	+	+
Tripton soja agar (TSA)	++/±	++/±	++/±	±	++/±	++/±	++/±	+	+	+	+	+
Levadura malta agar (YMA)	±/±	±/±	±/±	±	±/±	±/±	±/±	±/±	±/±	±/±	±/±	±/±
Agar nutritivo (NA)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

^a Pruebas de crecimiento, asimilación, o producción (++)= fuerte, (+) = débil, (-)= negativo.

^b Datos de *D. violaceinigra* YIM 31327^T fueron tomados de Li et al. (2004) y de *D. zoogloeoidea* IAM 12670^T de Hiraishi et al. (1997). nr= no citado. (+) Referido como utilización de fuentes de carbono en Li et al. (2004).descritas a la fecha

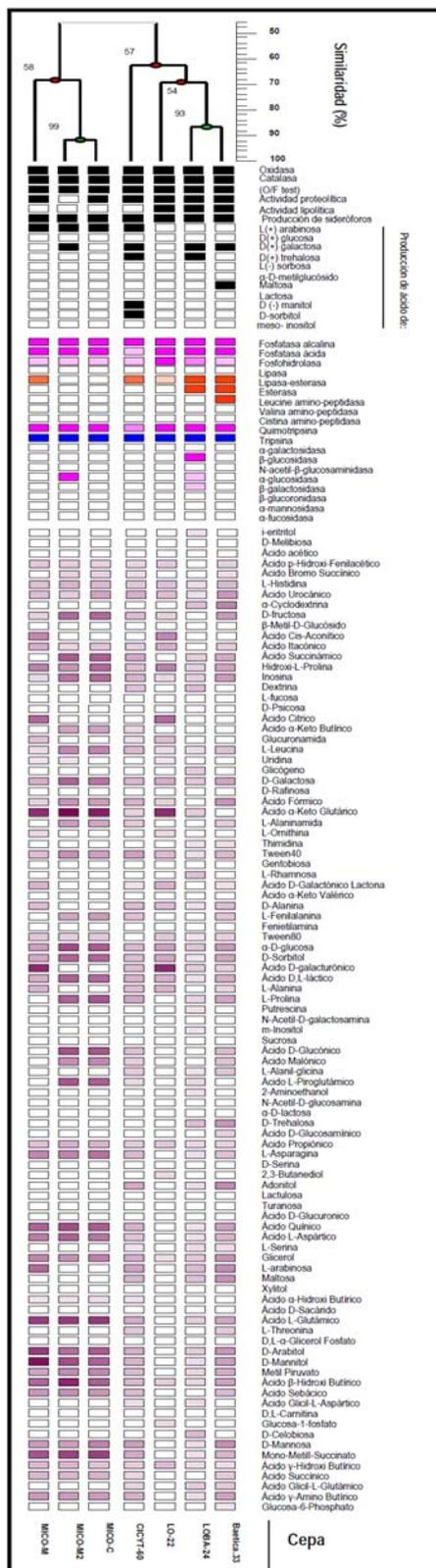


Figura VI.4. Análisis de Cluster combinando los datos fisiológicos de la Tabla VI.2, resultados APIZYM y Biolog GN2 de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados. El algoritmo UPGMA fue aplicado al consenso de la matriz de similaridad generada para cada experimento de forma independiente usando el coeficiente Dice (binario) o el coeficiente de correlación de Pearson (datos APIZYM y Biolog). Valores en los nodos indica el soporte de 'bootstrap'.

Basados en el análisis cluster de características fenotípicas (Tabla VI.2) en las pruebas de APIZYM y Biolog GN2, las siete cepas pudieron ser claramente diferenciadas y fueron consistentemente agrupadas en dos o tres clusters principales ya sea cuando los datos de cada una de ellas fueron procesadas independientemente (Fig. VI.S1 suplementaria) o cuando los datos de los tres experimentos fueron combinados (Fig. VI.4). En general, hubo una tendencia de las cepas de olivo silvestre a agruparse juntas (alto soporte de 64-100%) con algunas excepciones. La cepa CICYT-60 proveniente de olivo cultivado mostró una posición intermedia siendo en algunos casos más cercana a las cepas de olivo silvestre, mientras en otras a las de olivo cultivado dependiendo del set de datos analizados (Fig. VI.4; Fig. VI.S1 suplementaria).

VI.4.4. Detección, producción y extracción de violaceína y análisis filogenético de *vioA*

Todas las cepas de olivo y la cepa *D. violaceinigra* CCUG 50881T (= cepa tipo YIM 31327^T) poseen el gen *vioA* para la producción de violaceína (determinada por la amplificación de un fragmento de ~1.0 kb utilizando el par de iniciadores VPA3/VPA4, *datos no mostrados*). Hasta donde sabemos, esta es la primera demostración que *D. violaceinigra* posee genes para la producción de violaceína. También todas las cepas de olivo produjeron violaceína, evidenciada por la determinación cuantitativa mediante espectrofotometría y cromatografía líquida (LC) (Figs. VI.1.G y VI.5A,B). Cuando los extractos crudos de violaceína fueron examinados por HPLC, la fracción recolectada consistió en un pico principal (6,5 min) para todas las cepas bacterianas (*datos no mostrados*). El espectro visible de UV de los extractos de violaceína cruda fue similar a la observada para la violaceína comercial obtenida de *J. lividum* (Sigma, Madrid, España) (Fig. VI.5B) y para la citada para otras bacterias productoras de violaceína incluyendo *Duganella* sp. B2, y *C. violaceum* (Jiang *et al.*, 2010; Retori y

Durán, 1998; Sánchez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009) con una fuerte absorción en la región visible debido a la resonancia de la violaceína (Riveros *et al.*, 1988) (Fig. VI.5B).

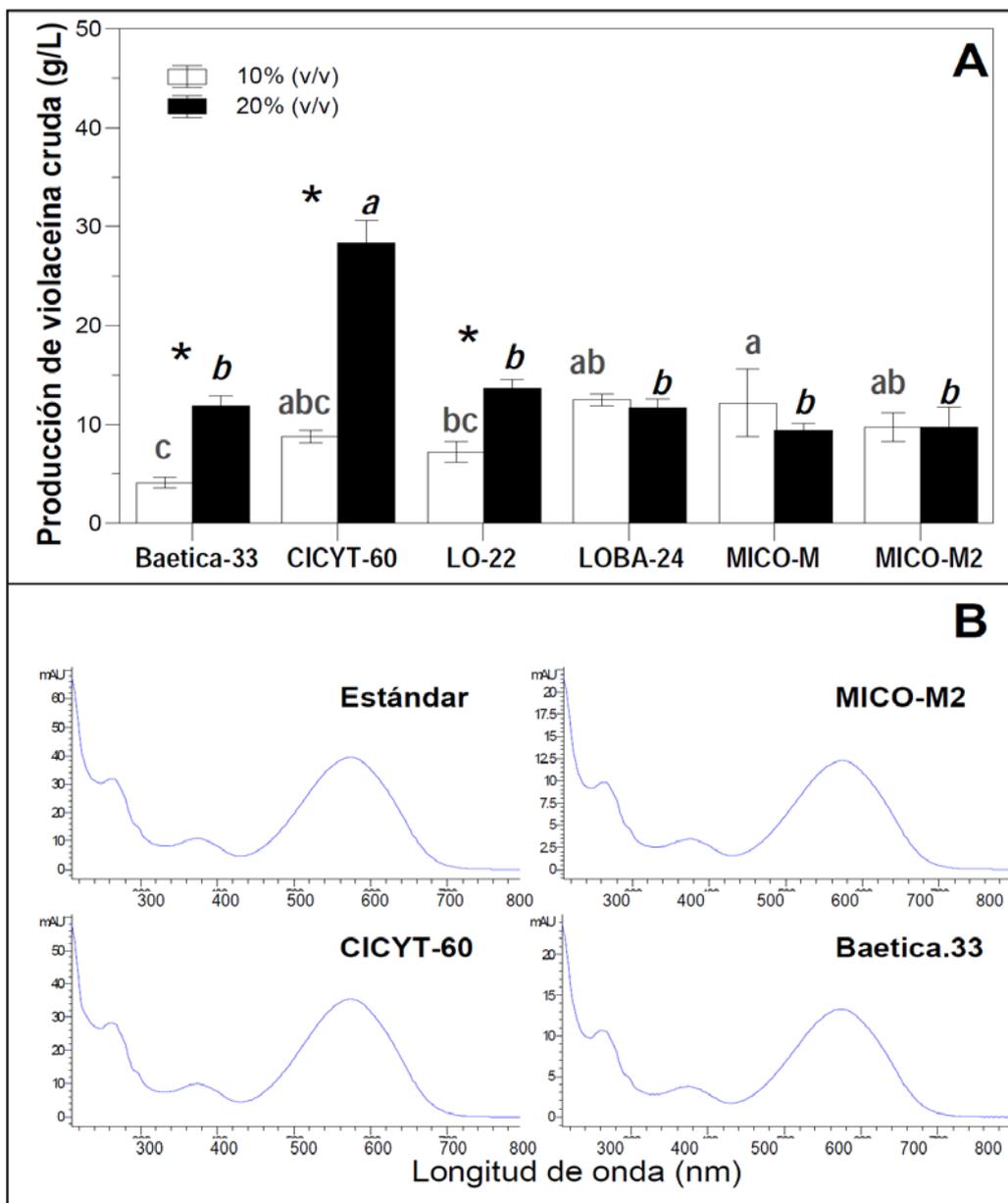


Figura VI.5. A. Producción de violaceína por *Duganella* spp. creciendo en el medio descrito por Wang *et al.*, 2009 usando 10% o 20% v/v de inicio del cultivo. Barras con diferente letra en mismo color y forma o con un asterisco (*) indicaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre cepas o entre cultivos iniciales, respectivamente, de acuerdo al contraste protegido de Fisher de las mínimas diferencias significativas. Los resultados son valores de medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. B, Espectro visible-UV de la violaceína comercial y extracto crudo en etanol de cultivos de *Duganella* spp. de olivo silvestre (Baetica.33) y cultivado (CICY-60 y MICO-M2). Para evitar repetición, únicamente tres espectros UV-vis de HPLC de cepas seleccionadas son mostrados.

Además de lo anterior, la adición de ácido sulfúrico al 10% a los extractos de violaceína cruda en etanol, cambió el color violeta a verde, y cuando se agregó NaOH, cambió a un color café rojizo, tal como fue descrito para la solución de violaceína en etanol de *J. lividum* (Shivaji *et al.*, 1991).

Las cepas bacterianas difirieron significativamente ($P < 0,0001$) en su habilidad para producir violaceína cuando ésta fue determinada para un número similar de células/ml ($OD_{600} 1.280 \pm 0,1879$) en la fase estacionaria de crecimiento después de 48h de incubación a 25°C (Fig. VI.5A). Las cepas Baetica-33, CICYT-60, y LO-22 produjeron significativamente cantidades más altas ($P < 0,0001$) de violaceína cuando el cultivo fue iniciado con 10% (v/v) que con 20% (v/v) de un cultivo bacteriano en la fase estacionaria (Fig. VI.5A). Cuando el cultivo bacteriano se inició con 10% (v/v) para algunas cepas (Baetica-33, LO-22), la producción de violaceína fue evidente sin embargo no abundante ($OD_{585} = 0,230-0,405$; equivalente a 4,10-7,22 mg/L). En contraste, cuando el cultivo se inició con 20% (v/v), la cepa CICYT 60 produjo cantidades significativamente ($P < 0.0001$) más altas de violaceína cruda ($OD_{585} = 1,585$; equivalente a 20,30 mg/L) en comparación con las otras seis cepas.

El análisis filogenético del gen parcial *vioA* agrupó a *Duganella* sp. B2 como un grupo basal de las secuencias restantes de *Duganella* spp. (soporte de 62%) mostrando una similaridad más alta en la secuencia del gen *vioA* con todas las secuencias de *J. lividum* (80,4-81,2%) que con todas las *Duganella* spp. incluyendo las cepas de olivo y la cepa tipo de *D. violaceinigra* (77,3-77,9%). *D. violaceinigra* fue un grupo basal de todas las cepas de *Duganella* spp. de olivo y de una muestra de suelo de Ithaca, Nueva York, EE.UU. (89% soporte; 89,8-90,8% similaridad) (Brady *et al.*, 2001) (Fig. VI.3B). Dentro de este cluster, las siete *Duganella* spp. se agruparon de acuerdo a su huésped de origen, olivo silvestre (LOBA-24, LO-22, Baetica-33) o cultivado (CICYT-60, MICO-C, MICO-M, MICO-M2) con homología en las secuencias en un rango de 91,6 a 91,8% entre ambos grupos. Las secuencias de *vioA* de las cepas de olivos cultivados

estuvieron mas cercanas (91,67-92,0%) a la de la muestra de suelo de Ithaca (Fig. VI.53B).

VI.4.5. Actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*

Las cepas productoras de pigmento morado de olivo mostraron muy baja o ninguna actividad de inhibición *in vitro* contra las cuatro bacterias gram-negativas y cinco hongos evaluados (Fig. VI.1.H). Por el contrario, las cepas bacterianas y los filtrados de la violaceína cruda mostraron de moderada (2 mm inhibición del halo de crecimiento) a fuerte inhibición (1 cm diámetro de halo en el punto de inoculación) respectivamente, contra la bacteria gram-positiva (*B. subtilis*) evaluada en nuestro estudio (Fig. VI.1.I). Es de destacar que únicamente los filtrados crudos de la violaceína de las cepas LOBA-24, LO-22, Baetica-33 y CICYT-60 inhibieron el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los halos de inhibición de los filtrados de violaceína cruda fueron similares para todas las cepas bacterianas y equivalentes a la observada cuando se utilizó la violaceína comercial (50 μ M).

VI.5. DISCUSIÓN

Debido a la fuerte competición entre los microorganismos del suelo, la rizosfera es considerada un reservorio potencial y una fuente de nuevas especies microbianas o cepas de diverso interés biotecnológico. (Ryan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2004; Weisskopf *et al.*, 2008). Por lo tanto, las bacterias de la rizosfera pueden ser una fuente de metabolitos secundarios novedosos tales como nuevas moléculas con potencial uso como fármacos y antibióticos los cuales pueden tener aplicación en medicina humana y veterinaria, agricultura o industria. La rizosfera de árboles leñosos silvestres y cultivados, como el olivo, una de las especies de más larga

longevidad y riqueza en biodiversidad genética, es un medio ambiente inexplorado que puede constituir una buena fuente de tales compuestos. Los pigmentos microbianos, como la violaceína, pueden proporcionar una ventaja para la supervivencia de ciertos microorganismos en su medio ambiente natural (Liu y Nizet, 2009) y se ha comprobado que éstos pueden ser una buena fuente de importantes compuestos biotecnológicos.

En nuestro estudio, aislamos siete cepas bacterianas con pigmentación morada de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado que fueron caracterizadas fisiológica, bioquímica y genéticamente como nuevas *Duganella* spp. productoras de violaceína. Estas cepas pudieron ser diferenciadas en base a los análisis fenotípicos y genéticos en dos grupos de acuerdo al huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado). Varios estudios previos han obtenido evidencia experimental acerca de la influencia selectiva de genotipos específicos, cultivares e incluso ecotipos de la planta huésped sobre la estructura de las comunidades bacterianas contenidas en la rizosfera (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005; Landa *et al.*, 2006). En el sur de España, un estudio reciente (Belaj *et al.*, 2010) reveló que los olivos silvestres representan un cluster genético diferenciado constituyendo un pool genético independiente de los cultivares de olivo locales y de los olivos silvestres presentes en otras diferentes e importantes áreas olivareras de España. Lo anterior, puede explicar que las cepas de *Duganella* spp. aisladas en este estudio se agruparan independientemente de acuerdo al origen de su huésped (olivo silvestre *versus* olivo cultivado).

Muchas de las bacterias productoras de violaceína, incluyendo muchas *Duganella* spp., han sido descritas como bacterias psicrotolerantes o psicrófilas debido a que han sido aisladas de medio ambientes acuáticos fríos, incluyendo mares, lagos, sedimentos de lagos, glaciares, nieve y de suelos de la tundra alpina ártica (Jiang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2009; Männistö y Häggblom, 2006; Matz *et al.*, 2008). Sin embargo, las siete cepas bacterianas de este estudio han sido aisladas de climas Mediterráneo marítimo y Mediterráneo subtropical con una temperatura media mucho más alta que las anteriormente citadas (Tabla VI.1).

Recientemente, Hervàs *et al.* (2009) demostraron la inmigración de bacterias, incluyendo *Duganella* spp., transportadas por aire desde África que pudieron alcanzar los lagos de las altas montañas de Europa. Sin embargo, el análisis NJ incluyendo esas secuencias parciales de 16S indicaron que éstas forman un linaje diferente de las *Duganella* spp. de olivo (Fig. VI.3). Finalmente, hasta donde sabemos, solo hay una cita de *Duganella* sp. asociada a plantas, y habitando específicamente la raíz de arroz (Sun *et al.*, 2008).

Nuestras cepas difieren en muchas características fisiológicas y en la secuencia de los genes 16S ADNr y *gyrB* con respecto a la especie tipo de *Duganella* (*D. zoogleoides*) (Hiraishi *et al.*, 1997), así como con el aislado de *Duganella* sp. B2, una bacteria psicrófila aislada de un glaciar en Tianshan, China, que ha sido recientemente descrita como una nueva bacteria productora de violaceína (Jiang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2009). La secuencia 16S ADNr de *Duganella* spp. de olivo silvestre y cultivado mostraron una homología más alta con la de la cepa tipo de *D. violaceinigra* YIM 31327 descrita por Li *et al.* (2004), pero difirió claramente en la secuencia del gen *gyrB*, y en algunas características fisiológicas (Tabla VI.2), principalmente en la producción de ácido a partir de la glucosa en forma oxidativa, actividad oxidasa, así como en al menos entre 2 a 5 actividades enzimáticas determinadas por el sistema API en comparación con los datos citados por Li *et al.* (2004). Es de destacar que nuestras cepas mostraron alta homología (99,6-99,7%) con la secuencia EF584756 de la 16S ADNr de una de nueva especie propuesta de *Duganella* (*D. nigrescens* sp. nov.; Cui, Chen, Li y Xu, *datos no publicados*) aislada en China; sin embargo, no hay más información disponible al respecto. Por otra parte, los análisis filogenéticos de las secuencias *vioA* confirmaron los resultados previos y revelaron que nuestras cepas de *Duganella* spp. son claramente diferentes de la cepa *Duganella* sp. B2 y de la cepa tipo *D. violaceinigra* YIM 31327.

Basados en nuestros resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas y en los análisis filogenéticos de los genes 16S ADNr, *gyrB* y

vioA, se han identificado dos grupos genéticos diferentes de *Duganella* spp. que pueden ser asociados con su huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado) que podrían ser potencialmente consideradas como nuevas especies de *Duganella* spp. no descritas con anterioridad habitando la rizosfera de árboles de olivo. Por ello, proponemos el uso de *Duganella oleae* sp. nov (Etimología: El nombre es derivado del nombre del género de su planta huésped) para las cepas CICYT-60, MICO-C, MICO-M y MICO-M2 aisladas de olivo cultivado; y el nombre *Duganella baetica* sp. nov. (Etimología: El epíteto refiere a la provincia Romana Baetica que incluye la mayor parte del sur de España) para las cepas Baetica-33, LO-22 y LOBA-24, aisladas de olivo silvestre. Además, basados en los análisis filogenéticos de los genes 16S ADNr, *gyrB* y *vioA*, consideramos que la posición taxonómica de la cepa B2, la primera *Duganella* sp. productora de violaceína citada hasta la fecha, debería ser reconsiderada.

Todas nuestras cepas crecieron y produjeron el pigmento morado mejor a 25°C en el medio R2A pero no en NA. La producción normal del pigmento para *C. violaceum* ocurre a 15, 20 y 25°C (Innis y Mayfield, 1979). Por el contrario, la cepa *Duganella* sp. B2, la nueva bacteria productora de violaceína (Jiang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2009), mostró buen crecimiento y producción del pigmento morado en medio NA. También observamos una producción inestable del pigmento morado en medio de cultivo con temperaturas de incubación subóptimas, especialmente para algunas de las cepas. Esta producción inestable del pigmento morado ha sido observada en otras cepas productoras de violaceína incluyendo la cepa de *Duganella* sp. B2 (Wang *et al.*, 2009) y *J. lividum* (Gillis y De Ley, 2006). La estabilidad en la producción del pigmento es un importante parámetro que debería ser tomado en consideración en la producción de la violaceína a escala industrial.

Investigaciones previas han demostrado que la producción de violaceína para las bacterias productoras de violaceína incluyendo *C. violaceum*, *Duganella* sp., *J. lividum* y *P. luteoviolacea* es afectada por diversos factores de crecimiento y condiciones de cultivo tales como la

temperatura, agitación, volumen de cultivo, componentes del medio y pH (Inniss y Mayfield, 1979; Lu *et al.*, 2009; Pantanella *et al.*, 2007; Stephens, 2004; Wang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2007). Sin embargo, además de factores físicos y nutricionales, en la mayoría de los casos la producción de la violaceína depende de las características genéticas de cada cepa en particular (Mendes *et al.*, 2001). Los niveles de producción de violaceína en las cepas de *Duganella* aisladas de olivo parece ser una característica individual de las cepas ya que no hubo diferencias significativas de acuerdo a su huésped de origen (i.e., olivos silvestres *versus* olivos cultivados). El hecho que obtuviéramos altos niveles de producción de violaceína de forma natural para la mayoría de las cepas de *Duganella* spp. sin intentar ninguna optimización del proceso, las hace atractivas para futuras investigaciones y aplicaciones biotecnológicas debido a que los bajos rendimientos de violaceína se consideran una de las principales limitaciones de las cepas silvestres para su producción y explotación comercial (Jiang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). Es de destacar que todas las cepas aisladas de olivo tuvieron niveles de producción natural de violaceína mas altos (de x1,2 hasta x65 veces) que los niveles citados previamente para otras bacterias productoras de violaceína cuando éstas crecieron en condiciones óptimas tales como la cepa de la Amazonia *C. violaceum* (0,43 g/L) (Mendes *et al.*, 2001), *J. lividum* (3,50 g/L) (Lu *et al.*, 2009), y la primera *Duganella* sp. B2 productora de violaceína recientemente citada (1,62 g/L) (Jiang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). Así, la cepa CICYT-60 de *Duganella* sp. produjo casi 18 veces más que *Duganella* sp. B2, que alcanzó su máxima producción de violaceína (1.62 g/L) en el mismo medio óptimo usado en este estudio y que contenía almidón soluble como única fuente de carbono (Wang *et al.*, 2009).

Una de las múltiples propiedades biológicas de la violaceína es su actividad antimicrobiana. En trabajo previos, el pigmento violeta producido por *C. violaceum* y *J. lividum* mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas, pero no contra bacterias gram-negativas y levaduras (Durán *et al.*, 1983; Durán y Menck, 2001; Nakamura *et al.*,

2002). En nuestro trabajo, hemos evaluado la actividad antimicrobiana de las bacterias y del extracto crudo de violaceína contra bacterias fitopatógenas gram-negativas y gram-positivas. Encontramos efecto antimicrobiano contra las dos bacterias gram-positivas evaluadas, la fitopatógena *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y una cepa de *B. subtilis* antagonista contra *V. dahliae* aislada de la rizosfera de olivo. Estos resultados indican que al parecer la violaceína actúa sobre sitios específicos de la pared celular de las bacterias gram-positivas. Barreto *et al.* (2008) demostraron que tanto las células como el sobrenadante de dos cepas brasileñas de *C. violaceum* mostraron actividad antifúngica contra diversos hongos incluyendo una especie de *Fusarium* sp.; sin embargo, en su estudio no fueron concluyentes acerca del principal mecanismo envuelto en la actividad antifúngica. En nuestros resultados, el pigmento morado producido por los aislados de *Duganella* spp. no inhibieron el crecimiento de ningún hongo fitopatógeno del suelo seleccionado. Es de destacar que en un trabajo reciente llevado a cabo por Becker *et al.* (2009) se demostró que en la naturaleza la salamandra 'red-backed' (*Plethodon cinereus*), mantiene en su cuerpo la actividad antifúngica de *J. lividum* produciendo violaceína, previniendo la enfermedad y muerte de la población debido a la chytridiomicosis, una enfermedad causada por *Batrachochytrium dendrobatidis*. Esto sugiere que existe un mutualismo entre bacterias productoras de violaceína y *P. cinereus*. Por otra parte, diferentes aislados bacterianos quitinolíticos identificados como *Collimonas* spp. que fueron capaces de crecer a expensas de hifas intactas, vivas de varios hongos del suelo han sido aislados de dunas con suelos ligeramente ácidos en los países bajos (de Boer *et al.*, 2004). Este género bacteriano ha sido recientemente citado como un nuevo productor de violaceína (Hakvåg *et al.*, 2009). Hemos observado que dos de las cepas de *Duganella* sp. (MICO-M y MICO-M2) fueron aisladas de olivos cultivados que habían sido previamente micorrizados en el vivero de olivo antes del trasplante (B.B. Landa, M. Montes-Borrego y S. Aranda, *resultados no publicados*). En condiciones naturales, los hongos micorrízicos están rodeados e

interactuando con comunidades bacterianas complejas y específicas, las cuales pueden modular la simbiosis micorrízica. Dentro de estas comunidades bacterianas, es conocido el caso de las “mycorrhiza-helper bacteria” las cuales ayudan a la formación de micorrizas y también interactúan positivamente en el funcionamiento de la simbiosis. El árbol del olivo es una planta especialmente micotrófica, como ha sido demostrado para plantaciones establecidas de olivo que mostraron estructuras de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de forma consistente en su sistema radical (Calvente *et al.*, 2004). Es importante destacar que todos los olivos silvestres y cultivados muestreados en este estudio tienen HMA en su sistema radical (B.B. Landa, M. Montes-Borrego y S. Aranda, *resultados no publicados*); sin embargo, aún es necesario determinar si existe una interacción entre HMA y *Duganella* spp.

Las especies de *Duganella* de olivo mostraron bajo o nulo antagonismo contra la mayoría las bacterias y hongos evaluados. Consideramos que la carencia de actividad antimicrobiana *in vitro* no se debe correlacionar necesariamente con la eficacia de actividad antimicrobiana *in vivo*, tal como ha sido demostrado para otras bacterias (Kamilova *et al.*, 2006). En este contexto, la presencia de antibióticos y glucosa se ha demostrado que inhiben la producción de violaceína y la formación de biofilm en *J. lividum* (Pantanella *et al.*, 2007). Lo anterior, puede explicar la carencia de antagonismo *in vitro* observado en nuestro estudio, dado que la composición del medio Waksman agar usado en los cultivos duales contiene proporciones altas de glucosa. Además, el desarrollo del biofilm y la producción de violaceína por *C. violaceium*, *J. lividum* y *P. tunicata* están reguladas por ‘quorum sensing’ (Matz *et al.*, 2008; McClean *et al.*, 1997), lo cual podría indicar que su formación es consecuencia de una respuesta al estrés producido por el medio ambiente y a un mecanismo de supervivencia.

Independientemente de la producción de violaceína, también observamos que las cepas de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados mostraron actividad proteolítica y lipolítica y una débil

producción de sideróforos. Es conocido que rizobacterias productoras de sideróforos mejoran el estado sanitario de las plantas a varios niveles, tales como la nutrición por hierro, y dificulta el crecimiento de patógenos, generalmente hongos, a través de limitar el hierro disponible para el crecimiento del patógeno (Kloepper *et al.*, 1980). Por lo tanto, el hecho de que las *Duganella* spp. de olivo mostraran actividad proteolítica, lipolítica y producción de sideróforos debería implicar una mejor capacidad de competencia como habitante de la rizosfera del olivo. Sin embargo, si este hecho también implica algún potencial antagonista contra hongos del suelo, bacterias fitopatógenas, nematodos fitoparásitos, y protozoos en la rizosfera del olivo, requiere realizar más investigaciones al respecto. Finalmente, consideramos que las cepas de *Duganella* spp. aisladas de olivos silvestres y cultivados pueden tener potencial biotecnológico y agronómico, lo cual merece una investigación más extensa en el futuro incluyendo: 1) determinación de las condiciones óptimas para obtener un mejor rendimiento de violaceína de esas cepas silvestres; 2) condiciones para obtener una colonización de la rizosfera, establecimiento y supervivencia óptimas para estas bacterias después de la inoculación de plantones de olivo; y 3) determinación de su efecto en el crecimiento y establecimiento, así como, en la supresión de agentes fitopatógenos de suelo después del trasplante de plantones de olivo a suelos naturales. Además, investigaciones futuras deberían enfocarse a determinar la significación ecológica de la asociación específica y a largo plazo entre *Duganella* spp. con olivos centenarios silvestres y cultivados y con sus comunidades bacterianas autóctonas asociadas a la rizosfera, especialmente con micorrizas.

VI.6. BIBLIOGRAFÍA

- Andrighetti-Fröhner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. y Simoes, C.M.O. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98: 843-848.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M. y Baldoni, L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics 98: 411-421.
- Balibar, C.J. y Walsh, C.T. 2006. In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. Biochemistry 45: 15444-15457.
- Barreto, E.S., Torres, A.R., Barreto, M.R., Vasconcelos, A.T.R., Astolfi-Fihlo, S. y Hungria, M. 2008. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 783-790.
- Becker, M.H., Brucker, R.M., Schwantes, C.R., Harris, R.N. y Minbiole, K.P.C. 2009. The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. Applied and Environmental Microbiology 75: 6635-6638.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Satovic, Z. y Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. Scientia Horticulturae 124: 323-330.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Ebert, L., Zock, A. y Smalla, K. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. Applied & Environmental Microbiology 68: 3328-3338.
- Bergey, D.H. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. (Eds). Baltimore: Williams & Wilkins, pgs. 636-642.
- Bergsma-Vlami, M., Prins, M. E. y Raaijmakers, J. M. 2005. Influence of plant species on population dynamics, genotype diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. FEMS Microbiology Ecology 52: 59-69.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P. y Bervillé, A. 2002. Olea europaea (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. Theoretical & Applied Genetics 104: 1353-1361.

- Brady, S.F., Chao, C.J., Handelsman, J., Clardy, J., 2001. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Organic Letters* 3: 1981-1984.
- Bronzini, V., Giannettini, J., Gambotti, C. y Maury, J. 2002. Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica* 123: 263-271.
- Caldas, L.R., Leitao, A.C.C., Santos, S.M. y Tyrrel, R.M. 1978. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. *International Symposium on Current Topics Radiobiology and Photobiology*, Rio de Janeiro, Brasil, pgs. 121-131.
- Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. y 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: 11-19.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. y Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied & Environmental Microbiology* 61: 1720-1726.
- De Azevedo, M.B.M., Alderete, J., Rodríguez, J.A., Souza, A.O., Rettori, D., Torsoni, M.A. Faljoni-Alario, A., Haun, M. y Durán, N. 2000. Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 37: 93-101.
- De Boer, W., Leveau, J.H.L., Kowalchuk, G.A., Klein Gunnewiek, P.J.A., Abeln, E.C.A., Figge, M.J., Sjollem, K., Janse, J.D., y van Veen, J.A. 2004. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 857-864.
- De Carvalho, D.D., Costa F.T.M., Durán, N. y Haun, M. 2006. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro* 20:1514-1521.
- Dessaux, Y., Elmerich, C. y Faure, D. 2004. Violacein: A molecule of biological interest originating from the soil-borne bacterium *Chromobacterium violaceum*. *La Revue de Medicine Interne* 25: 659-662.
- Durán, N., Erazo, S. y Campos, V. 1983. Bacterial chemistry-II: Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 55: 231-234.

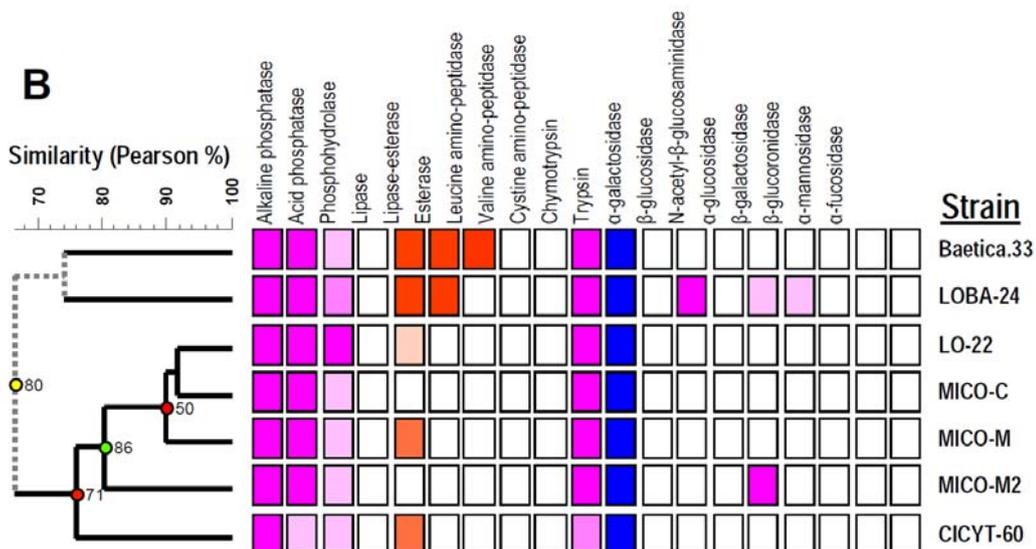
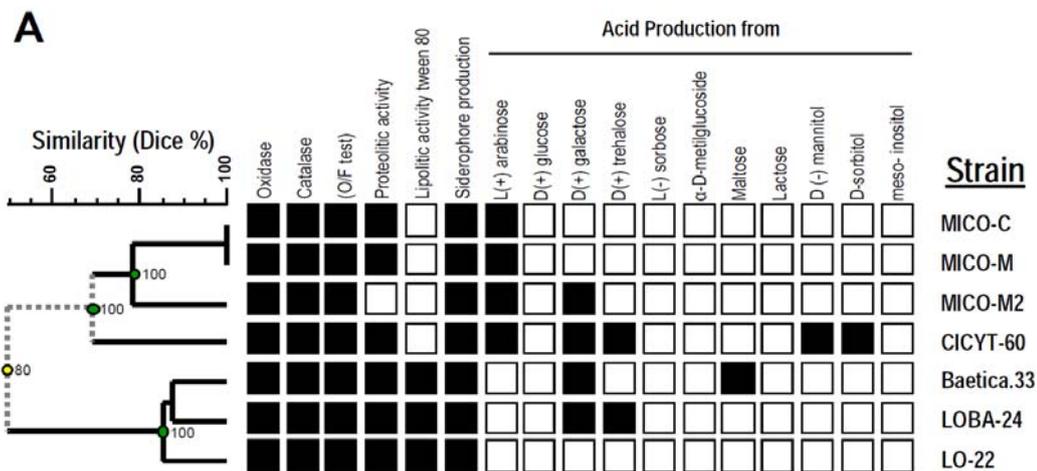
- Durán N., Antonio, R.V., Haun, M. y Pilli, R.A. 1994. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 10: 686-690.
- Durán, N. y Menck, C.F. 2001. *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives. Critical Reviews in Microbiology 27: 201-222.
- Durán, N., Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Melo, P.S., Cordi, L. y Martins, D. 2007. Violacein: Properties and biological activities. Biotechnology & Applied Biochemistry 48: 127-133.
- Gillis, M. y De Ley, J. 2006. The Genera *Chromobacterium* and *Janthinobacterium*. Prokaryotes 5: 737-746.
- Green, P.S. 2002. A revision of *Olea* L. (Oleaceae). Kew Bulletin 57:91-140.
- Hakvåg, S., Fjaervik, E., Klinkenberg, G., Borgos, S.E.F., Josefsen, K.D., Ellingsen, T.E. y Zotchev, S.B. 2009. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. Marine Drugs 7: 576-588.
- Hervàs, A., Camarero, L., Reche, I. y Casamayor, E.O. 2009. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe. Environmental Microbiology 11: 1612-1623.
- Hiraishi, A., Shin, Y.-K. y Sugiyama, J. 1997. Proposal to reclassify *Zoogloea ramigera* IAM 12670 (P. R. Dugan 115) as *Duganella zoogloeoides* gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 1249-1252.
- Hugh, R. y Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various oxidative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.
- Inniss, W.E. y Mayfield, C. I. 1979. Effect of temperature on violacein production in a psychrotrophic *Chromobacterium* from Lake Ontario sediment. Microbial Ecology 5: 51-56.
- IOOC (International Olive Oil Council), 2009. World olive oil figures. Available at: <http://www.internationaloliveoil.org/web/aaingles/corp/AreasActivitie/economics/Area sActivitie.html>.
- Issaoui, M., Mechri, B., Echbili, A., Dabbou, S., Yanghi, A., Belguit, H., Trigui, A. y Hammami, M. 2008. Chemometric characterization of five Tunisian varieties of *Olea europaea* L. olive fruit according to different maturation indices. Journal of Food Lipids 15: 277-296.

- Jiang, P-X., Wang, H-S., Zhang, C., Lou, K. y Xing, X-H. 2010. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. *Applied Microbiology & Biotechnology* 86: 1077-1088.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.A., Makarova, N. y Lugtenmerg, B. 2006. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* and the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1121-1126.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. y Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.M., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2003. Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 93: 982-994.
- Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder K.L., Allende-Molar R. y Weller, D.M. 2006. Enrichment and genotypic diversity of pHID-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 351-368.
- Li W.J., Zhang Y.Q., Park D.J., Li C.T., Xu L.H., Kim C.J. And Jiang C.L., 2004. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1811-1814.
- Liu, G.Y. y Nizet, V. 2009. Color me bad: Microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology* 17: 406-413.
- Logan, A.N. 1989. Numerical taxonomy of violet-pigmented, Gram-negative bacteria and description of *Iodobacter fluviatile* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 450-456.
- Lu, Y., Wang, L., Xue, Y., Zhang, C., Xiang, X., Lou, K., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, G., Bi, J. y Su, Z. 2009. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal* 43: 135-141.
- Lumaret, R. y Ouazzani, N. 2001. Ancient wild olives in Mediterranean forests. *Nature* 413: 700.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F. y Di Giusto, F. 2004. Allozyme variation of oleaster populations wild olive tree *Olea europaea* L. in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92: 343-351.

- MacCarthy, S.A., Sakata, T., Kakimoto, D. y Johnson, R.M. 1985. Production and isolation of purple pigment by *Alteromonas luteoviolacea*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 51: 479-484.
- Männistö, M.K. y Häggblom, M.M. 2006. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. Systematic & Applied Microbiology 29: 229-243.
- Margalith, P.Z. 1992. Pigment Microbiology. Chapman and Hall, London.
- Matz, C., Dienes, P., Boeningk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. y Jürgens, K. 2004. Impacts of violacein-producing bacteria on survival and feeding of *Bacteriovorus nanoflagellates*. Applied & Environmental Microbiology 70: 1593-1599.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., Steinberg, P. y Kjelleberg, S. 2008. Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. PLoS ONE 3: e2744. doi:10.1371/journal.pone.0002744.
- Mavrodi, D.M., Peever, T.L., Mavrodi, O.V., Parejko, J.A., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Mazurier, S., Heide, H., Blankenfeldt, W., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 2010. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. Applied & Environmental Microbiology 76: 866-879.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. y Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology 143: 3703-3711.
- Mendes, A.S., De Carvahlo, J.E., Duarte, M.C.T., Durán, N. y Bruns, R.E. 2001. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. Biotechnology Letters 23: 1963-1969.
- Michelakis, N. 2002. Monumental olive trees in the world, in Greece and in Crete. Proceedings of International Symposium, Sitia, Crete, Greece.
- Nakamura, Y., Sawara, T., Morita, Y. y Tamiya, E. 2002. Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. Biochemical Engineering Journal 12: 79-86.
- Nakamura, Y., Asada, C. y Sawada, T. 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotrophic bacterium RT102 strain. Biotechnology & Bioprocess Engineering 8: 37-40.
- Pantanella, F., Berlutti, F., Passariello, S., Sarli, S., Morea, C. y Schippa, S. 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. Journal of Applied Microbiology 102: 992-999.

- Rettori, D. y Durán, N. 1998. Production, extraction and purification of violacein: An antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14: 685-688.
- Riveros, R., Haun, M., Campos, V. y Durán, N. 1988. Bacterial Chemistry-IV. Complete characterization of violacein: An antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. Arquivos de Biologia e Tecnologia 31: 475-487.
- Ruhul-Momen, A.Z.M. y Hoshino, T. 2000. Biosynthesis of violacein: Intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-Hydroxyndole side. Bioscience Biotechnology & Biochemistry 64: 539-549.
- Ryan, R. P., Dessaux, Y., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. Plant & Soil 321: 363-383.
- Sánchez, C., Braña, A.F., Méndez, C. y Salas, J.A. 2006. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationships to indolocarbazole biosynthesis. ChemBioChem 7: 1231-1240.
- Sciancalepore, V., Colangelo, M., Sorlini, C. y Ranalli, G. 1996. Composting of effluent from a new two-phases centrifuge olive mill. Toxicological & Environmental Chemistry 55: 145-158.
- Schwyn, B. y Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160: 47-56.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendoca, D., Rodrigues, M., Dos Santos, M., Machado, L. y Machado, A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Molecular Ecology 9: 1171-1193.
- Shirata, A., Tsukamoto, T., Yasui, H., Hayasaka, T., Hayasaka, S., Kojima A. y Kato, H. 2000. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. Japan Agricultural Research Quarterly 34: 131-140.
- Shivaji, S., Ray, M.K., Seshu Kumar, G.S., Reddy, G.S.N., Saisree, L. y Wynn-Williams, D.D. 1991. Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula. Polar Biology 11: 267-271.
- Stephens, C. 2004. Microbial genomics: tropical treasure?. Current Biology 14: R65-R66.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. y Song, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. Microbial Ecology 55: 415-424.

VI.7. MATERIAL SUPLEMENTARIO



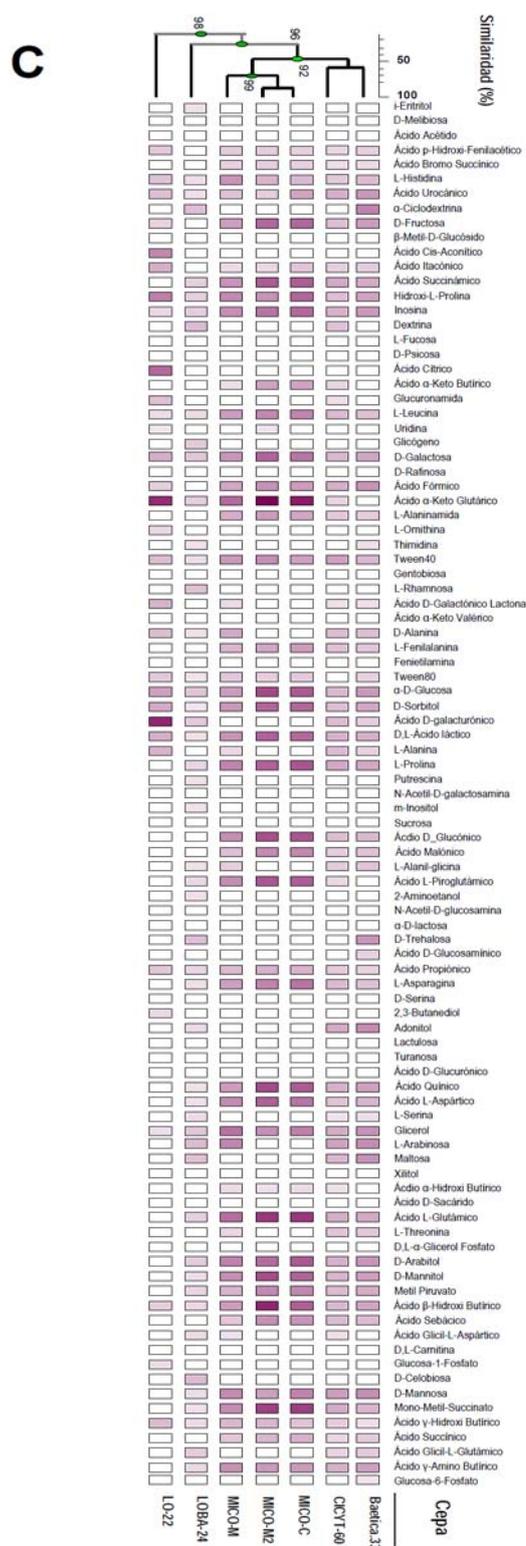


Figura VI.S1. Análisis de Cluster combinando los datos fisiológicos de la Tabla VI.2 (A), resultados APIZYM (B) y Biolog GN2 (C) de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados. El algoritmo UPGMA fue aplicado al consenso de la matriz de similaridad generada para cada experimento de forma independiente usando el coeficiente Dice (binario, Tabla VI.2,A) o el coeficiente de correlación de Pearson (datos APIZYM (B) y Biolog(A)). Valores en los nodos indica el soporte de 'bootstrap'.

Tabla VI. S1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción del pigmento morado en medio R2A de las cepas aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado

T ^a	Olivo silvestre			Olivo cultivado			
	LO-22	LOBA-24	Baetica-33	Mico-C	Mico-M	Mico-M2	CICYT-60
4	-/- ^a	±/-	-/-	-/-	±/-	±/-	±/-
15	+/+	+/+	+/+	+/-	+/ \pm	+/ \pm	+/ \pm
20	++/++	++/ \pm	+/+	+/-	++/ \pm	++/ \pm	++/+
25	++/++	++/++	++/++	++/ \pm	++/++	++/++	++/++
28	++/+	++/+	++/+	++/ \pm	++/+	++/+	++/+
30	++/+	++/ \pm	++/ \pm	++/-	++/-	++/-	++/+
34	+/-	+/-	±/-	+/-	+/-	+/-	+/-
37	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
40	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

^a Crecimiento/producción de pigmento morado (++)= fuerte, (+) = positivo, (\pm)= débil ó (-)= negativo.

CAPÍTULO VII

VI.1

DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años las investigaciones realizadas en el área de la Ecología Microbiana han revelado la existencia de una extraordinaria diversidad filogenética, abundancia relativa, alta especificidad funcional y dinámica poblacional de microorganismos presentes en diversos medio ambientes. Dentro de este contexto, el estudio de las comunidades bacterianas en el suelo y la rizosfera de las plantas ha sido objeto de numerosas investigaciones entre Microbiólogos y Agrónomos debido al fuerte impacto que éstas ejercen no solamente sobre las plantas en diversas actividades funcionales relevantes como crecimiento, nutrición y/o salud de las mismas, sino también para ser utilizados como indicadores del grado de estabilidad de diversos parámetros funcionales de un ecosistema. Investigaciones previas han documentado que las especies de árboles y plantas herbáceas afectan diferencialmente la composición y crecimiento de las comunidades microbianas contenidas en la rizosfera (DeLong *et al.*, 2002; Marschner *et al.*, 2001). A pesar de lo anterior, en la literatura son pocas las investigaciones realizadas en este sentido en plantas de tejido leñoso como es el caso del olivo. Sin embargo, en la actualidad, la gran importancia del cultivo del olivo en la zona del Mediterráneo, ha incrementado el interés en el desarrollo de investigaciones enfocadas al estudio de las comunidades bacterianas asociadas a este cultivo. La presente Tesis Doctoral aborda el estudio de la estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en el suelo y rizosfera del olivo en Andalucía y como diversos componentes del ecosistema agrícola del olivar. pueden condicionar y determinar estas comunidades.

Así, en uno de los objetivos de la Tesis fue determinar la influencia específica del cultivar de plantones de olivo certificados, el efecto del vivero de origen del material vegetal, así como el efecto del tiempo de crecimiento en un suelo natural sobre las comunidades bacterianas totales y cultivables de la rizosfera y endosfera utilizando para ello un análisis basado en técnicas cultivo-dependientes e independientes. Para ello se estudiaron los seis genotipos de plantones de olivo más importantes de Andalucía

incluyendo Picual, Arbequina Hojiblanca, Frantoio, Manzanillo y Picudo, que provenían de viveros comerciales productores de material certificado.

Los resultados indican que el genotipo del olivo tiene una marcada influencia en la densidad inicial de población de bacterias cultivables totales (BCT) y *Pseudomonas* spp. (Ps) en la rizosfera y endosfera de los diferentes plantones de olivo y a su vez el vivero de origen tiene otro elevado papel en esa variación. En general los cultivares Arbequino y Frantoio presentaron los mayores densidades de población. El análisis FT-RFLP de las comunidades bacterianas totales de la rizosfera también agrupó a los diferentes cultivares de olivo de acuerdo al vivero de procedencia. Por otro lado, las poblaciones de BCT y Ps fluorescentes en la rizosfera y endosfera variaron significativamente en función del tiempo de crecimiento en condiciones de campo en un suelo natural, el cultivar de origen y sus interacciones, manteniéndose unos niveles de población estables o con tendencia creciente durante los 18 meses de duración del experimento. Así mismo, el análisis FT-RFLP de las comunidades bacterianas totales de la rizosfera de seis cultivares de olivo muestreados en distintos tiempos de crecimiento diferenció a los tratamientos en primer lugar en función del tiempo de muestreo y en segundo lugar en función del genotipo de olivo, indicando que la estructura de población bacteriana en la rizosfera de olivo está determinada fuertemente en el momento del trasplante por el genotipo de procedencia, posteriormente existe cierta homogeneización en la diversidad de la estructura de las comunidades bacterianas tras 12 meses después del trasplante aun suelo natural, tras lo cual el efecto marcado del genotipo se vuelve a manifestar a los 18 meses de crecimiento, fundamentalmente en los cultivares Arbequina y Picual.

Cambios en la estructura genética de las poblaciones microbianas en la rizosfera sobre el tiempo han sido descritas previamente (Chiarini *et al.*, 2000; Di Cello *et al.*, 1997). En cultivos arbóreos (que se pueden considerar monocultivos), la composición de los microorganismos de la rizosfera cambia sustancialmente en función de diversos factores

involucrados. Así, Benizri *et al.* (2005) demostró un mayor efecto del tiempo de crecimiento sobre las comunidades bacterianas cultivables en la rizosfera de melocotonero por encima de otros factores estudiados, y más aún, resalta que las comunidades bacterianas mostraron un perfil distinto en la utilización de fuentes de carbono en diferente tiempo de muestreo, revelando un posible efecto estructural sobre las comunidades bacterianas solamente con factores ambientales o de crecimiento de la planta. Por otra parte, Rumberger *et al.* (2007), encontró diferencias significativas en las densidades de población y estructura de las comunidades de bacterias, hongos y Oomycetes cultivables contenidas en la rizosfera de manzano al evaluarlas mediante la técnica FT-RFLP (empleada en esta Tesis Doctoral), tanto en función del tiempo de muestreo como del genotipo del patrón. Estos autores concluyeron que la composición de las comunidades bacterianas y fúngicas en la rizosfera fue altamente variable y cambió con la estación y año de muestreo.

Los resultados obtenidos en los diferentes genotipos de olivo indican claramente que existen variaciones en la estructura y densidad de las poblaciones bacterianas iniciales en la rizosfera y endosfera en función del tiempo y genotipo. Muchos factores bióticos han sido estudiados acerca de la influencia que ejercen sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera; sin embargo el efecto más consistente en este sentido es relacionado con cambios en la composición de los exudados radicales. Varios autores (e.g., Griffiths *et al.*, 1999; Kozdroj y van Elsas, 2000; Yang y Crowley, 2000) en sus investigaciones han postulado que los cambios en la composición de los exudados de la raíz tienen un efecto sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera. Las diferencias en la densidad de población en los genotipos de olivo puede ser debido a diferencias en la composición específica y cantidad de los rizodepósitos que sirven como fuente de carbono, nitrógeno y energía que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas específicas. En esta Tesis Doctoral no se estudió la rizodeposición, por lo que se desconoce los componentes de los exudados radicales de los diferentes genotipos de olivo. Por tanto, en

futuras investigaciones un análisis de esta naturaleza permitiría profundizar en la interacción de este factor con las comunidades microbianas contenidas en la rizosfera, principalmente en relación al estímulo que condiciona el desarrollo y desplazamiento de poblaciones bacterianas específicas diferenciadas por la utilización de sustratos particulares en función de estas variaciones temporales de los exudados. De los genotipos de olivo evaluados, Frantoio es la que alberga una densidad de población más alta que el resto, mientras que Picudo y Hojiblanca registraron densidades de población más bajas. Es interesante resaltar que las diferencias en las densidades en estos genotipos pudieran también tener un papel y una relación aún no explorada en la resistencia y susceptibilidad que manifiestan estos materiales contra la Verticiliosis del olivo. En este sentido, el cv. Frantoio es considerado un material con tolerancia a *V. dahliae* patotipo defoliante mientras que el cv. Picudo y Hojiblanca se consideran material altamente susceptibles (Landa et al., 2009). En este contexto, Rumberger *et al.* (2007) encontró que patrones de manzano con mayor nivel de resistencia contra la enfermedad del replante son capaces de sustentar densidades de bacterias y hongos cultivables más altas en su rizosfera en comparación con los patrones susceptibles a esta enfermedad.

Actualmente, nuevos enfoques en los sistemas de manejo del suelo y técnicas agronómicas de cultivo del olivo se han ido desarrollado en función de la necesidad de generar nuevos sistemas de explotación adecuados a disminuir el impacto medioambiental, como la degradación del suelo, escasez del agua y el desarrollo de técnicas capaces de mejorar y preservar la calidad y fertilidad del suelo principalmente en regiones semiáridas del Mediterráneo. En Andalucía, existen diversos sistemas de cultivo del olivo que abarcan desde olivares tradicionales, a nuevos sistemas intensivos y superintensivos, y por otro lado sistemas de producción con un enfoque sostenible basado en producción integrada y orgánica frente a los de alta aportación de insumos químicos. En los últimos años las investigaciones sobre la influencia de diferentes sistemas de manejo del suelo en general han estado dirigidas principalmente al

impacto que éstos tienen en la erosión del suelo, disponibilidad y pérdida de nutrientes y agua en olivares del Mediterráneo, sin embargo actualmente cada vez existe un mayor interés en estudiar el efecto de estos diferentes sistemas de manejo sobre las características funcionales y metabólicas de las comunidades microbianas del suelo y rizosfera.

Por lo anterior, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se consideró como un objetivo principal el analizar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas totales en suelos de olivar en dos de las áreas más representativas para el cultivo del olivo en la provincia de Córdoba (*Sierra Morena* y *Campiña*), y determinar el efecto sobre estas comunidades en función de los factores: zona climática, tipo de suelo, y sistema de manejo del mismo. Los resultados de esta investigación revelaron que existe una diferenciación de las comunidades bacterianas de la rizosfera en olivo en base a la localización de las dos zonas de cultivo evaluadas y los diferentes sistemas de manejo del suelo efectuados. Las comunidades bacterianas de suelo fueron claramente discriminadas en función del tipo de manejo de suelo (laboreo o control de la cubierta con ganado) realizado en la zona de *Sierra Morena* destacando una transición entre las comunidades microbianas desde zonas naturales hacia el empleo de ganado o el suelo con laboreo ligero. Por otro lado en la *Campiña* también existió una diferenciación de las comunidades microbianas respecto a los diferentes sistemas de manejo del suelo (laboreo frente a desbroce) que a su vez se diferenciaron claramente de las zonas naturales. En general los suelos de las zonas de *Sierra Morena* y las de *Campiña* con cubierta presentaron los mayores niveles de diversidad medidos por la Riqueza y el índice de Shannon.

Nuestros resultados indican que la localidad y tipo de suelo son factores primarios que determinan la estructura de las poblaciones microbianas y que éstas son influenciadas por los diferentes sistemas de manejo del suelo, resaltando la importancia que los sistemas de manejo tienen en la dinámica poblacional de la microbiota del mismo. Los cambios en la estructura y dinámica de las comunidades microbianas del suelo

como respuesta a diferentes sistemas de manejo en sistemas agrícolas representa un interesante indicador del estatus del suelo con respecto a su calidad y complejidad (Anderson, 2003; Visser y Parkinson 1992). Investigaciones en olivo han demostrado una influencia positiva de un sistema de manejo sostenible del olivar sobre las características bioquímicas del suelo y sobre la diversidad genética microbiana (Benítez *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2005). Adicionalmente, Moreno *et al.* (2009) resalta la influencia del no laboreo y uso de cubiertas sobre la diversidad genética microbiana contenida en el suelo.

La diversidad funcional de las comunidades microbianas incluyen el rango y la expresión relativa de actividades implicadas en funciones tales como descomposición, transformación de nutrientes, promoción del crecimiento de las plantas y supresión de enfermedades, entre otros (Giller *et al.*, 1997). Uno de los efectos mas comunes que se generan con el uso del laboreo es la pérdida de carbono orgánico del suelo utilizable por los microorganismos, el cual regula el funcionamiento y actividad de las comunidades microbianas heterotróficas en el mismo. Esto podría explicar que un manejo del suelo más sostenible que incluye las prácticas de laboreo ligero y uso de cubiertas vegetales, está más asociado a una mayor diversidad genética, funcional y metabólica de microorganismos del mismo que en otros sistemas de manejo. Así, Carrera *et al.* (2007) y Sofo *et al.* (2010) demostraron que los índices de la diversidad metabólica de las bacterias del suelo estimadas mediante el sistema BIOLOG CLPP son usualmente mas altos en suelos con un manejo sostenible que en suelos con manejo tradicional y que la inclusión del uso de cubiertas vegetales dentro del manejo sostenible podría ser un importante factor positivo en esta condición. Otras investigaciones en olivares en el Mediterráneo han demostrado el efecto de un sistema de manejo sostenible basado en prácticas de no laboreo por utilización de cubiertas vegetales espontáneas y material de poda, fertilización y riego por goteo, observando mayor rendimiento y calidad del fruto y una mayor diversidad genética y funcional microbiana en contraste con un manejo tradicional caracterizado por un

sistema de cultivo de secano, laboreo 2-3 veces al año y fertilización mineral anual (Sofo *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral aportan evidencias del efecto que ejercen factores como la localidad, tipo de suelo y el efecto de diferentes sistemas de manejo del mismo sobre las características estructurales y funcionales de las comunidades bacterianas del suelo en dos localidades de Andalucía. La importancia del conocimiento de los factores que están influenciando la diversidad estructural y funcional de la microbiota del suelo en el olivo, son relevantes debido a que representan un índice de la calidad actual del suelo a partir del cual es posible predecir los efectos del manejo actual del suelo y proveer información relevante sobre el estatus funcional del mismo en relación a la diversidad microbiana. El desarrollo de este conocimiento permitiría determinar si un sistema de manejo en particular u otros factores implicados en el mismo compromete la estabilidad y/o resiliencia de un sistema tan complejo como lo es el suelo en el reciclado de nutrientes a través de los efectos sobre la diversidad funcional microbiana en los diferentes sistemas de explotación del olivo actualmente utilizados.

Como otra parte integral de esta Tesis Doctoral se determinó la estructura y diversidad genética de las comunidades bacterianas totales en la rizosfera y suelo de acebuches silvestres y olivares centenarios en sistemas naturales o agrícolas, mediante diversos métodos moleculares y biotecnológicos de análisis de poblaciones microbianas y se conformó una colección de aislados bacterianos cultivables de la rizosfera de olivo silvestre de dos provincias de Andalucía (Córdoba y Cádiz) con alta capacidad antagonista contra *V. dahliae* patotipo defoliante *in vitro*. Actualmente, dentro de las consideraciones importantes en la búsqueda de microorganismos con potencial uso como inoculantes microbianos en determinados cultivos se encuentra la exploración de la rizosfera de estas plantas en su forma silvestre, o en el centro de origen o centro genético primario de diversificación, o en explorar la amplitud de su diversidad genética. Este tipo de materiales genéticos se consideran reservorios

genéticos microbianos de gran potencial biotecnológico para diversas disciplinas científicas.

En este contexto, el olivo se caracteriza por contener una alta riqueza de recursos genéticos (Ganino *et al.*, 2006). Belaj *et al.* (2010), estudiando la diversidad y relaciones filogenéticas entre cultivares locales y silvestres de olivo en tres regiones olivareras en España (Andalucía, Cataluña y Valencia), encontraron que existe una gran variación alélica y altos valores de diversidad genética en estas tres importantes zonas de cultivo de olivo y que particularmente en Andalucía las poblaciones de olivo silvestre (acebuches) conformaban un cluster genético separado e independiente del resto de olivares cultivados de la misma área y de las otras zonas olivareras, así como del resto de las poblaciones de olivo silvestre en España. Estos resultados sugieren que las poblaciones silvestres de olivo en Andalucía pueden representar verdaderos olivos silvestres y no formas asilvestradas o 'ferales', por lo que estas zonas se constituyen como un interesante recurso genético para su exploración en diversas áreas de la biotecnología agrícola. Los resultados obtenidos en esta investigación mediante el análisis FT-RFLP del ADN total de la rizosfera de diferentes muestras de olivo silvestre, y suelos de olivares cultivados centenarios indican que las comunidades bacterianas en la rizosfera del olivo silvestre difieren de las observadas en olivo cultivado conformando un cluster independiente lo cual fundamenta el interés de explorar las poblaciones bacterianas cultivables contenidas en la rizosfera y endosfera del acebuche con actividad antagonista contra *V. dahliae*.

Por ello, se obtuvieron un total de 675 aislados cultivables de la rizosfera y endosfera de 11 muestras de olivo silvestre, de los cuales 94 (14%) mostraron diferentes niveles de antagonismo contra *V. dahliae* a través de la producción de diversas enzimas y metabolitos secundarios involucrados en su actividad inhibidora. El 85% de los antagonistas fueron *Bacillus* spp. (56.4% del total) y *Pseudomonas* spp (27.7%). En numerosas investigaciones se ha determinado que *Pseudomonas* y *Bacillus* son constituyentes importantes en la rizosfera de diversas plantas herbáceas

(Donate-Correa *et al.*, 2004; Poonguzhali *et al.*, 2006) esta misma situación al parecer prevalece en cultivos de tejido leñoso. Sin embargo, también existen diferencias que pudieran revelar la importancia funcional y específica de estas poblaciones en cultivos de tejido leñoso. En la rizosfera de olivo silvestre, *Pseudomonas* spp. fue el grupo predominante y no en la endosfera; en contraste con los resultados obtenidos en café revelaron que el género más común encontrado en la rizosfera fue *Bacillus* spp. (Muleta *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que en la rizosfera de huéspedes de tejido leñoso también puede existir un alto grado de especificidad en donde es posible encontrar poblaciones distintivas colonizando este microambiente.

Independientemente de su actividad antagonista *in vitro*, *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. son dos grupos importantes de bacterias que son conocidos por establecer una importante asociación benéfica en la rizosfera y endosfera, en particular están estrechamente asociados a la habilidad para movilizar el fosfato y nitrógeno insoluble en el suelo, nutrientes de difícil acceso para las plantas (Cocking, 2003; Miller *et al.*, 2010). Particularmente, es de especial interés este último, que es considerado el nutriente mas importante por su influencia en el crecimiento vegetativo, rendimiento y calidad en el olivo (Fernández-Escobar, 2008b). Por otra parte, diversas especies de estos grupos son considerados promotores del crecimiento en las plantas (PGPR), sin embargo difieren en la habilidad de síntesis de auxinas como el ácido indol-3-acético (AIA) como precursores del crecimiento los cuales desempeñan un papel relevante en el desarrollo y resistencia a enfermedades. Un alto porcentaje de los antagonistas obtenidos del olivo silvestre mostraron la capacidad de producir AIA, sideroforos, quitinasa y otros metabolitos secundarios. Esta actividad se ha demostrado en investigaciones previas que está relacionada con la capacidad de solubilización del fósforo y otros elementos (Vassilev *et al.*, 2006). La producción simultánea de hormonas y otros metabolitos secundarios, el fuerte antagonismo *in vitro* mostrado contra *V. dahliae* aunado a la eficiencia en la solubilización de minerales esenciales, tiene gran significancia desde el punto de vista agronómico de

aplicación y explotación de estas rizobacterias en olivo como promotores de crecimiento, fertilizantes biológicos e inductores de resistencia como parte integral en estrategias de manejo en sistemas de producción con un enfoque orgánico y/o sostenible de bajos insumos agrícolas.

El origen de las poblaciones endofitas ha sido motivo de diferentes investigaciones en muchos cultivos, varios estudios han sugerido que estas poblaciones se originan del suelo y la rizosfera conformando subpoblaciones a partir de esos microambientes con una fuerte influencia de la especie de la planta como factor dominante en seleccionar y determinar la composición de estas comunidades (Germida *et al.*, 1998; Mendes *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). El origen de las poblaciones endofitas en olivo silvestre y cultivado es desconocido, pocos son las investigaciones abordando el estudio de las interacciones con estas poblaciones en olivo, y se desconoce si estas poblaciones son transmitidas verticalmente a partir de material vegetal de propagación o semilla. En los últimos años, diversas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido considerados agentes de control biológico e inoculantes microbianos ideales dada la versatilidad de producir antibióticos y otros metabolitos secundarios, colonizar el tejido interno de las plantas como endofitos con mayor eficiencia que otros agentes biológicos y por la producción de endoesporas en el caso solo de *Bacillus* lo que permite diseñar formulaciones comerciales más estables, duraderas y fácil de manejar. Los resultados de esta investigación ha permitido conformar una colección de aislados bacterianos autóctonos en la rizosfera y endosfera de olivo silvestre con alto potencial antagonista *in vitro* contra *V. dahliae* patotipo defoliante los cuales son considerados representan aislados altamente específicos y mucho mejor adaptados debido a su estrecha relación genética con el olivo en busca de una mayor adaptabilidad y estabilidad en el proceso de colonización e interacción como inoculantes microbianos con la planta huésped. Lo anterior resalta la necesidad de realizar investigaciones futuras enfocadas en evaluar su eficacia como antagonistas y como promotores del crecimiento (fertilizantes biológicos)

en el cultivo de olivo bajo condiciones de invernadero en material de propagación y campo, además de su estabilidad y persistencia como inoculantes microbianos en diferentes materiales genéticos. A partir de este conocimiento, uno de los mayores retos en futuras investigaciones es el poder manejar comunidades microbianas en busca de alternativas para favorecer la colonización y estabilidad de bacterias beneficiosas lo cual representa en la actualidad uno de los principales limitantes en el desarrollo de sistemas de control biológico basados en el uso de bacterias.

Otros antagonistas encontrados en menor proporción en la rizosfera y endosfera del olivo silvestre fueron identificados como *Paenibacillus* spp. *Chryseobacterium vrystaatense*, *Rhodococcus wratislaviensis* y *Rahnella* sp. representando estos últimos la primera cita como antagonistas habitando la rizosfera y endosfera del olivo. Adicionalmente, los resultados de esta investigación aportan nuevos conocimientos sobre los constituyentes microbianos en la rizosfera del olivo silvestre y cultivado con aplicación en otras áreas de la investigación. En este contexto, se han identificado bacterias como *Duganella* spp. que producen un pigmento morado insoluble en agua que está relacionada a la capacidad de producir violaceína, compuesto con alto potencial biotecnológico en la medicina e industria. Algunos de los aislados obtenidos del olivo silvestre y cultivado con esta característica han demostrado la capacidad de producir mayores cantidades del extracto crudo de violaceína que otras cepas citadas en la literatura científica. El análisis filogenético de estos aislados reveló una clara separación de grupos en base a su origen (olivo silvestre o cultivado). Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran el alto grado de especificidad y el potencial de la rizosfera del olivo de contener poblaciones bacterianas con importantes aplicaciones biotecnológicas en agricultura y en otras áreas y que pueden tener un alto impacto económico y medioambiental. Prueba de ello es la protección mediante Patente (P201031655) de tres de las cepas de *Duganella* spp. que se han propuesto como especies nuevas: *Duganella oleae* sp. nov. CICYT-60 y MICO-M, y *Duganella baetica* LO-22.

VI.2

CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. El tipo de suelo y su sistema de manejo determinan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo de olivares en fincas con manejo orgánico en el sur de España.
2. La técnica FT-RFLP ha demostrado ser una herramienta eficaz para el estudio de la estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo, y puede además ser utilizada para asociar grupos taxonómicos operacionales específicos (OTUs) con distintos sistemas de manejo que podrán ser utilizados como indicadores de calidad o del sistema de manejo en olivares de Andalucía.
3. El vivero de origen, el genotipo del olivo y el tiempo de crecimiento en un suelo natural son factores que determinan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas totales, y la densidad de población de bacterias cultivables heterotróficas y de *Pseudomonas* fluorescentes más abundantes en la rizosfera y endosfera de plantones de olivo certificados.
4. Las comunidades bacterianas de la rizosfera de olivo silvestre difieren claramente de las de formas asilvestradas de olivos cultivados constituyendo reservorios únicos de diversidad bacteriana.
5. La rizosfera y endosfera de olivos silvestres constituyen una fuente importante de bacterias con alto potencial antagonista contra el hongo de suelo *Verticillium dahliae*.

6. Diferentes especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* fluorescentes son los antagonistas de *V. dahliae* mayoritarios presentes en el sistema radical de olivos silvestres, presentando la capacidad de producir diferentes enzimas hidrolíticas, ácido indol-3-acético y compuestos antimicrobianos, por lo que podrían ser considerados como potenciales agentes de biocontrol de *V. dahliae* en olivo.

7. De la rizosfera de olivo, tanto silvestre como cultivado, se han aislado, identificado y caracterizado bacterias con alto rendimiento en producción de violaceína pertenecientes al género *Duganella*, que pueden ser consideradas nuevas especies bacterianas con interés para diversas aplicaciones biotecnológicas en medicina, industria y agricultura, entre otras.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abby, S. y Daubin, V. 2007. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. *Trends in Microbiology* 15: 135-141.
- Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y. y Allen, V. 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2762-2770.
- Ahn, J.H., Kim, M.C., Shin, H.C., Choi, M.K., Yon, S.S., Kim, T., Song, H.G., Lee, G.H. y Ka, J.O. 2006. Improvement of PCR amplification bias for community structure analysis of soil bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 1561-1569.
- Álvarez, S., Soriano, M.A., Landa, B.B. y Gómez, J.A. 2007. Soil properties in organic olive groves compared with that natural areas in a mountainous landscape in southern Spain. *Soil Use and Management* 23: 404-416.
- Alvey, S., Yang, C.H., Buerkert, A. y Drowley, D.E. 2003. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. *Biology and Fertility of Soils* 37: 73-82.
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agriculture Ecosystem & Environment* 98: 285-293.
- Andreote, F., Azevedo, J.L. y Araújo, W.L. 2009. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 417-432.
- Anónimo. 2002. Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras de Andalucía. <http://www.iea.junta-andalucia.es/anuario/anuario02>
- Anónimo. 2004. Estadística Data Bases Faostat-Agriculture, Crops Primary. <http://www.fao.org>.
- Anónimo. 2006a. Ministerio de Agricultura y Pesca. <http://www.mapa.es/es/agricultura/agricultura.htm>
- Anónimo. 2006b. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. <http://www.juntadeandalucia/agriculturaypesca/portal/opencms/portal/navegación.jsp>
- Antonopoulos, D.F., Tjamos, S.E., Antonio, P.P., Rafaletes, P. y Tjamos, E.C. 2008. Effect of *Paenibacillus alvei* strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biological Control* 46: 166-170.
- Appuhn, A. y Joergensen, R.G. 2006. Microbial colonisation of roots as a function of plant species. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 1040-1051.

- Araújo, A.S.F., Santos, V.B. y Monteiro, R.T.R. 2007. Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in Piauí state, Brazil. *European Journal of Soil Biology* 44: 225-230.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, J. Jr., Pereira, O. y Ara, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3: 40-65.
- Bacilio-Jimenez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S. y Zenteno, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil* 249: 271-277.
- Bais, H.P., Fall, R. y Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* 134: 307-319.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. y Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in the rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.
- Baker, K.F. y Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens: Definitions. En: Hoy, M.A. y Herzog, D.C. (eds.). *Biological Control in Agricultural IPM Systems*. W.H. Freeman, San Francisco, pgs. 25-39.
- Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 6: 263-294.
- Barberán, A. y Casamayor, O.E. 2010. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1-10.
- Barer, M.R. y Harwood, C.R. 1999. Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology* 41: 93-137.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, E.J. y Jacobsen, B.J. 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 289-298.
- Barranco, D. 2008. Variedades y patrones. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. (eds). 6ª Ed. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid España, pgs. 64-92.
- Barranco, D., Rallo, L. y Fernández-Escobar, R. 2004. *El cultivo del olivo*. Ediciones Mundi-Prensa.

- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T. y García, C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147: 159-171.
- Beattie, G.A. 2006. Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. En: *Plant-associated Bacteria*. Gnanamanickam, S.S. (eds.). Dordrecht, the Netherlands: Springer, pgs. 1-56.
- Becker, R., Behrendt, U., Hommel, B., Kropf, S. y Ulrich A. 2008. Effects of transgenic fructan-producing potatoes on the community structure of rhizosphere and phyllosphere bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 66: 411-425.
- Bejarano-Alcazar, J. 2003. La Verticilosis del olivo: Bases ecológicas y epidemiológicas para el desarrollo de estrategias de control sostenibles en viveros y plantaciones de olivar. En: 8º Symposium Nacional de Sanidad Vegetal. Sevilla, España, pgs. 125-138.
- Bejarano-Alcazar, J. 2005. Control de la Verticilosis del olivo mediante la aplicación de enmiendas orgánicas. *Olea* 106: 40-51.
- Bejarano-Alcázar, J. Blanco-López, M.A., Melero-Vara, J.M. y Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Etiology, importance and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Disease* 80: 1233-1238.
- Bejarano-Alcázar, J., Pérez-Artés, E. y Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Spread of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* to new cotton- and olive-growing areas in Southern Spain. En: Proceedings of the 8th International *Verticillium* Symposium. Córdoba, España, pg. 57.
- Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldón L., Satovic, Z. y Barranco, D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae* doi: 10.1061/j.scienta.2010.01.010
- Bell, A.A. 1992. *Verticillium* wilt. En: R. J. Hillocks (ed.). *Cotton Diseases*. C.A.B. International, Oxon, UK, pgs. 87-126.
- Bell, A.A. 1994. Mechanisms of disease resistance in *Gossypium* species and variation in *Verticillium dahliae*. En: Constable, G.A. y Forrester, N.W. (eds). Proceedings of the World Cotton Research Conference-1. CSIRO, Melbourne, Australia, pgs. 225-235.
- Benitez, E., Nogales, R., Campos, M. y Ruano, F. 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32: 221-231.
- Benizri, E., Piutti, S., Verger, S., Pagès, L., Vercambre, G., Poessel, J.L. y Michelot, P. 2005. Replant diseases: Bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1738-1746.

- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. y Hallman, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 215-229.
- Biazini, D., Motta, A.S., Morrissy, J.A.C., Terra, R.M., Souto, A.A. y Brandelli, A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, an antimicrobial peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* 8: 125-131.
- Binet, M.N., Lemonie, M.C., Martin, C., Chambon, C. y Gianinazzi, S. 2007. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In Vitro Cell & Developmental Biology—Plant* 43: 473-478.
- Blanco-López, M.A. y Jiménez-Díaz, R.M. 1995. Una propuesta de lucha integrada contra la Verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional* 70: 52-58.
- Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M. y Caballero, J.M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of Verticillium wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea* 23: 1-8.
- Blouin-Bankhead, S., Landa, B.B., Lutton, E., Weller, D.M. y McSpadden-Gardener, B.B. 2004. Minimal changes in rhizobacterial populations structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 307-318.
- Bogosian, G. y Bourneuf, E.V. 2001. A matter of bacterial life and death. *EMBO European Molecular Biology Organization Reports* 2: 770-774.
- Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J. y Mumford, R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121: 355-363.
- Broeckling, C.D., Broz, A.K., Bergelson, J., Manter, D.K. y Vivanco, J.M. 2008. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 738-744.
- Brons, J.K. y van Elsas J.D. 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2717-2727.
- Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L. y Jurkevitch, E. 2009. The rhizosphere: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321 189-212.

- Buyer, J.S., Roberts, D.P. y Russek-Cohen, E. 1999. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 138-144.
- Caballero, J.M. y Del Rio, C. 2008. Métodos de Multiplicación. En: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R y Rallo, L. (eds). 6ª Ed. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid España, pgs. 93-125.
- Caballero, J.M., Pérez-Hernández, J., Blanco-López, M.A. y Jiménez-Díaz, R.M. 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. Proc. 5th Congress Mediterranean Phytopathol. Union, Patras, pg. 50.
- Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. y 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 and Soil Ecology* 26: 11-19.
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press, Cambridge, 218 pgs.
- CAP-JA, 2003. El olivar Andaluz. Consejería de Agricultura y Pesca (ed.). Servicio de Publicaciones y Divulgación: Sevilla, Spain.
- Caravaca, F., Hernández, T., García, C. y Roldán, A. 2002. Improvement of rhizosphere aggregate stability of afforested semiarid plant species subjected to mycorrhizal inoculation and compost addition. *Geoderma* 108: 133-144.
- Cardon, G.Z. y Gage, D.J. 2006. Resource exchange in the rhizosphere: Molecular tools and the microbial perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic* 37: 459-488.
- Carrera, L.M., Buyer, J.S., Vinyard, B., Abdul-Baki, A.A, Sikora, L.J. y Teasdale, J.R. 2007. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. *Applied and Soil Ecology* 37: 247-255.
- Castro, J., Fernández-Ondoño, E., Rodríguez, C., Lallena, A.M., Sierra, M. y Aguilar, J. 2008. Effects of different olive-grove management systems on the organic carbon and nitrogen content of soil in Jaén (Spain). *Soil & Tillage Research* 98: 56-67.
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A. y Blomberg, G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1950-1959.

- Chelius, M.K. y Triplett., E.W. 2001. The diversity of Archea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology* 41: 252-263.
- Chen, X-H., Koumoutsis A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K. y Schneider, I. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology* 25: 1007-1014.
- Chiarini, L., Giovannelli, V. y Tabacchioni, S. 2000. Different portions of the maize root system host Burkholderia cepacia populations with different degrees of genetic polymorphism. *Environmental Microbiology* 2: 111-118.
- Choudhary, D.K. y Johri, B.N. 2009. Interaction of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164: 493-513.
- Choudhary, D.K., Prakash, A. y Johri, B.N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanisms of action. *Indian Journal of Microbiology* 47: 289-297.
- Chouliaras, V., Tasioula, M., Chatzissavvidis, C., Therios, I. y Tsabolatidou, E. 2009. The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 984-988.
- Civantos, 2008. La olivicultura en el mundo y en España. En: D. Barranco., R. Fernández-Escobar., Rallo L. (eds.) *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, pgs. 18-35.
- Cocking, C.E. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil* 252: 169-175.
- Coenye, T., Gervers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P. y Swings, J. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 147-167.
- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R.W. y LiPuma, J.J. 2001. Taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3427-3436.
- Collado-Romero, M., Jiménez-Díaz, R.M. y Mercado-Blanco, J. 2010. DNA sequence analysis of conserved genes reveals hybridization events that increase genetic diversity in *Verticillium dahliae*. *Fungal Biology* 114: 209-218
- Collins, D.P. y Jacobsen, B.J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26: 153-161.

- Compant, S., Clément, C. y Sessitsch, A. 2009. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. y Barkea, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Conn, K.L., Tenuta, M. y Lazarovits, G. 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95: 28-35.
- Cook, R.J. 1990. Twenty five years of progress towards biological control. En: Hornby, D. (ed.) *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. CAB International. Wallingford, Oxon, (UK).
- Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*, St. Paul, Minnesota, 539 pgs.
- Correa, O.S., Montecchia, M.S., Berti, M.F., Ferrari, M.C.F., Pucheu, N.M., Kerber, N.L. y García A.F. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41: 185-194.
- Czarnota, M., Rimando, A. y Weston, I. 2003. Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of Chemical Ecology* 29: 2073-2083.
- Daayf, F., Nicole, M. y Geiger, J.P. 1995. Differentiation of *Verticillium dahliae* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. *European Journal of Plant Pathology* 101: 69-79.
- Davis, J.R., Huisman O.C., Westermann, D.T., Hafez, S.L., Everson, D.O., Sorensen, L.H. y Schenider, A.T. 1996. Effects of green manures on *Verticillium* wilt of potato. *Phytopathology* 86: 444-453.
- De Graaf, J., Duran, Z.V.H., Jones, N. y Fleskens, L. 2008. Olive production systems on sloping land: Prospects and scenarios. *Journal of Environmental Management* 89: 129-139.
- De La Fuente, L., Mavrodi, D.V., Landa, B.B., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2006. *phlD*-based genetic diversity and detection of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 64-78.

- Delaney, S.M., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F. y Thomashow, L.S. 2001. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Journal of Bacteriology* 183: 318-327.
- DeLong, R.L., Lewis, K.J., Simard, S.W. y Gibson, G. 2002. Fluorescent pseudomonad population sizes baited from soil under pure Birch, pure Douglas fir, and mixed forest stands and their antagonisms towards *Armillaria ostoyae* in vitro. *Canadian Journal of Forest Research* 32: 2146-2159.
- Di Cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S. y Dalmastrì, C. 1997. Biodiversity of a Burkholderia cepacia populations isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4485-4493.
- Dilly, O; Blume, H.P., Sehy, U., Jimenez, M. y Munch, J.C. 2003. Variation of stabilised, microbial and biologically active carbon and nitrogen in soil under contrasting land use and agricultural management practices. *Chemosphere* 52:557-569.
- Donate-Correa, J., León-Barrios, M. y Pérez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chameacytisus proliferus (tagasate), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil* 266: 261-272.
- Ducklow, H. 2007. 10th symposium on Aquatic Microbial Ecology (SAME 10). Faro, Portugal, pgs. 13-19.
- Edwards, S.G., McKay, T. y Seddon, B. 1994. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi –Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. En: Blakeman, J.P. y Williamson, B. (eds.). *Ecology of Plant Pathogens*. CAB International. Wallingford, Oxon, pgs. 101-118.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F.O. y Aman, R. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3044-3051.
- Ellis, R.J., Timms-Wilson, T. M., y Bailey, M.J. 2000. Identification of conserved traits in Fluorescent Pseudomonas with antifungal activities. *Environmental Microbiology* 2: 274-284.
- Emmert, E.A.B. y Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram -) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171: 1-9.
- Ercolani, G.L. 1991. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology* 21:35-48.

- Esperschütz, J., Gattinger, A., Mäder, P., Schloter, M. y Fließbach, A. 2007. Response of soil microbial biomass and community structures to conventional and organic farming systems under identical crop rotations. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 26-37.
- ESYRCE. 2007. Encuesta sobre Superficie y Rendimientos de cultivos. Subdirección General Estadísticas Agroalimentarias, SGT. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 26 pgs.
- Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M. y Kailis, S.G. 2004. Olive propagation manual. Landlinks Press. 160 pgs.
- Fan, TW-M., Lane, A.N., Shenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D. y Higashi, R.M. 2001. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry* 57: 209-221.
- Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W.M. y Akkermans, A.D.L. 1999. Searching for predominant soil bacteria 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 137-145.
- Fernández-Escobar, R. 2008b. Fertilización. En: Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. (eds). *El cultivo del olivo*. 6ª Ed. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid España, pgs. 297-336.
- Fernández-Escobar, R., Ortíz-Urquiza, A., Prado, M. y Rapoport, H.F. 2008a. Nitrogen stratus influence on olive tree flower quality and ovule longevity. *Environmental and Experimental Botany* 64: 113-119.
- Filion, M. 2008. Do transgenic plants affect rhizobacteria? *Microbial Biotechnology* 1: 463-475.
- Filion, M., Hamelin, R.C., Bernier, L. y St-Arnaud, M. 2004. Molecular profiling of the rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in nursery. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3541-3551.
- Fließbach, A; Oberholzer, H.R., Gunst, L. y Mäder, P. 2007. Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 118: 273-284.
- Francia, M.J.R., Durán Zuazo, V.H. y Martínez Raya, A. 2006. Environmental impact from mountainous olive orchard under different soil-management system (SE Spain). *Science of the Total Environment* 358:46-60.
- Francis, I., Holsters, M. y Vereecke, D. 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology* 12: 1-12.

- Fulthorpe, R.R., Roesch, L.F.W., Riva, A. y Triplet, W. 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *International Society for Microbial Ecology* 2: 901-910.
- Galand, P.E., Casamayor, E.O., Kirchman, D.L. y Lovejoy, C. 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 2247-22432.
- Galand, P.E., Potvin, M., Casamayor, E.O. y Lovejoy, C. 2010. Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *International Society for Microbial Ecology Journal* doi: 10.1038/ismej.2009.134.
- Gallego-Álvarez, F.C. 1994. La Verticilosis del Olivo. Control mediante inyecciones en el tronco de Carbendazima. *Fruticultura Profesional* 62:18-21.
- Ganino, T., Bartolini, G. y Fabril, A. 2006. The classification of olive germplasm -A review. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81: 319-344.
- Gans, J., Wolinsky, M. y Dunbar, J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-1390.
- García-Ruíz, R., Ochoa, V., Viñegla, B., Hinojosa, M.B., Peña-Santiago, R., Liébanas, G., Linares, J.C. y Carreira, J.A. 2009. Soil enzymes, nematode community and selected physico-chemical properties as soil quality indicators in organic and conventional olive farming: Influence of seasonality and site features. *Applied Soil Ecology* 41: 305-314.
- Garland, J.L. y Mills, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359.
- Garveba, P., van Veen, J.A. y van Elsas, J.D. 2004a. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243-270.
- Garveba, P., Voesenek, K. y van Elsas, J.D. 2004b. Quantitative detection and diversity of pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1453-1463.
- Gasser, I., Müller, H. y Berg, G. 2009. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms on and in plants. *FEMS Microbiology Ecology* 1: 142-150.
- Germida, J.J., Steven, D., Siciliano, J., de Freitas, R. y Seib, A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26: 46-50.

- Giller, K.E., Beare, M.H., Iavelle, P., Izac, A.-M.N. y Swift, M.J. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied and Soil Ecology* 6: 3-16.
- Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schnöfeld, J., Costa, R., Mendonça-Hagler, L. y Smalla, K. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil* 232: 1573-5036.
- Gómez, J.A., Amato, M., Celano, G. y Koubouris, C.G. 2008. Organic olive orchards on sloping land: More than a specialty niche production system?. *Journal of Environmental Management* 89: 99-109.
- Gómez, J.A., Giráldez, J.V., Pastor, M. y Fereres, E. 1999. Effect of tillage method on soil physical properties, infiltration and yield in an olive orchard. *Soil and Tillage Research* 52:167-175.
- Goodman, R.M., Bintrin, S.B., Handelsman, J., Quirino, B.F., Rosas, J.C., Simo, H.M. y Smith, K.P. 1998. A dirty look: Soil microflora and rhizosphere microbiology. En: Flores H.E., Lynch J.P., Eissenstat D. (eds) *Radical biology: Advances and perspectives on the function of plant roots*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pgs. 219-231.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Sayre, K.D., Crossa, J., Lichter, K., Troch, V., Vanherck, K., De Corte, P. y Deckers, J. 2008. Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on selected soil microflora groups in the subtropical highlands. *Applied Soil Ecology* 38: 197-210.
- Grayston, S.J. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 369-378.
- Grayston, S.J.; Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley J.L., Clegg, C.D., Ritz, K., Griffiths B.S., Rodwell, J.S., Edwards, S.J., Davies, W.J., Elston, D.J. y Millard, P. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology* 25 :63-84.
- Green, P.S. 2002. A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin* 57: 91-140.
- Green, S.J., Inbar, E., Michel, F.C., Jr, H.Y. y Minz, D. 2006. Succession of bacterial communities during early plant development: Transition from seed to root and effect of compost amendment. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3975-3983.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Ebbelwhite, N. Y Dobson, G. 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 145-153.

- Gross, H., Stockweel, V.O., Henkels, M.D., Nowak-Thompson B., Loper, J.E. y Gerwik, W.H. 2007. The genomisotopic approach: A systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chemistry & Biology* 14: 53-63.
- Gu, Y-H. y Mazzola, M. 2003. Modification of fluorescent pseudomonad community and control of apple replant disease induced in a wheat cultivar-specific manner. *Applied Soil Ecology* 24: 57-72.
- Haddad, F., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G. y Teixeira, H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49: 114-119.
- Haichar, F.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesden, J., Heulin, T. y Achouak, W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *International SportMed Journal* 2: 1221-1230.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. y Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Rodríguez-Kábana, R. y Kloepper, J.W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 925-937.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. y van Elsas, J.D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16: 463-471.
- Harris, D.C. 1998. An introduction to *Verticillium* wilts. En: Hiemstra, J. A. y Harris, D. C. (Eds). *A Compendium of Verticillium Wilts in Tree Species*. Ponsen and Looijen, Wageningen, the Netherlands, pgs. 1-4.
- Hartmann, A., Lemanceau, P. y Prosser, J.I. 2008. Multitrophic interactions in the rhizosphere. *Rhizosphere at the interface of many disciplines and expertise*. FEMS Microbiology Ecology 65: 179.
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tunien, D. y Berg, G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* 321: 235-257.
- Hawes, M., Bengough, G., Cassab, G. y Ponce, G. 2003. Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 352-367.
- Hawes, M., Gunawardena, U., Miyasaka, S. y Zhao, X. 2000. The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* 5: 128-133.
- Hernández, A.J., Lacasta, C. y Pastor, J. 2005. Effects of different management practices on soil conservation and soil water in a rainfed olive orchard. *Agricultural Water Management* 77: 232-248.

- Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballe, M., Hartmann, A., Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2005. Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50: 277-288.
- Hervás, A., Camarero, L., Reche, I. y Casamayor, E.O. 2009. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe. *Environmental Microbiology* 11: 1612-1623.
- Heuer, H., Kroppenstedt, R.M., Lottmann, J., Berg, G. y Smalla, K. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1325-1335.
- Hiemstra, J.A. 1998. Some general features of *Verticillium* wilt in trees. En: Hiemstra, J.A. y Harris, D.C. (eds.). *A Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species*. Posen y Looijen. Wageningen, Holanda, pgs. 5-11.
- Hochstrat, R., Wintgens, T., Melin, T. y Jeffrey, P. 2006. Assessing the European wastewater reclamation and reuse potential – a scenario analysis. *Desalination* 188: 1-8.
- Höflich, G., Tauschke, M., Kuhn, G., Werner, K., Frielinghaus, M. y Hohn, W. 1999. Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 29: 81-86.
- Inbar, E., Green, S.J., Hadar, Y. y Minz, D. 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. *Microbial Ecology* 50: 73-81.
- Jacobs, J.L., Fasi, A.C., Ramette, A., Smith, J.J., Hammerschmidt, R. y Sunding, G.W. 2008. Identification of onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3121-3129.
- Jamali, F., Sharifi-Tehrani, A., Lutz, M.P. y Maurhofer, M. 2009. Influence of host plant genotype, presence of a pathogen, and coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* strains on the rhizosphere expression of hydrogen cyanide and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in *P. fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Microbial Ecology* 57: 267-275.
- Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Jiménez-Gasco, M.M., Landa, B.B. y Navas-Cortés, J.A. 2010. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in Andalusia and agricultural factors influencing the

- distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* (en prensa).
- Jiménez-Díaz, R.M., Rodríguez Jurado, D., Navas-Cortés, J.A., Mercado-Blanco, J. y Trapero-Casas, J.L. 2003. Estrategias de control de la Verticilosis del olivo. *Vida Rural* 176: 36-40.
- Jiménez-Díaz, R.M., Tjamos, E.C. y Cirulli, M. 1998. Verticillium wilt of major tree hosts: olive. En: Hiemstra, J.A. y Harris, D.C. (eds.). *A Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species*. Posen y Looijen. Wageningen, Holanda, pgs. 13-16.
- Jiménez-Díaz, R.M., Trapero, C.J., Boned, J., Landa, B.B. y Navas Cortés, J.A. 2009. Uso de Bioten para la protección biológica de plantones de olivo contra la Verticilosis causada por el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 35: 595-615.
- Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Kinight, R. y Fierer, N. 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *International Society for Microbial Ecology Journal* 4: 442-453.
- Kaiser, O., Puhler, A. y Selbitschka, W. 2001. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microbial Ecology* 42: 136-149.
- Kamilova, F., Lamers, G. y Lugtenberg, B. 2008. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudates as well as subsequent formation of new spores. *Environmental Microbiology* 10: 2455-2461.
- Karpouzas, D.G., Ntougias, S., Iskidou, E., Rousidou, C., Papadopoulou, K.K., Zervakis, G.I. y Ehaliotis, C. 2010. Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology* 45:101-111.
- Karpouzas, D.G., Rousidou, C., Papadopoulou, K.K., Bekris, F., Zervakis, G.I., Singh, B.K. y Ehaliotis, C. 2009. Effects of continuous olive mill waste water applications, in the presence and absence of nitrogen fertilization, on the structure of rhizosphere-soil fungal communities. *FEMS Microbial Ecology* 70:388-401.
- Kent, A.D. y Triplett, E.W. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology* 56: 211-236.
- Kielak, A., Rodrigues, J.L.M., Kuramae, E.E., Chain, P.S.G., van Veen, A. y Kowalchuk, G.A. 2010. Phylogenetic and metagenomic analysis of *Verrucomicrobia* in former agriculture grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 23-33.

- Kinkel, L. 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 35: 327-347.
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, F. T. y Stuart, J. D. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 374-379.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C. y Fall, R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology* 185: 5627-56-31.
- Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pée, K.H. y Ligon, M.J. 1998. Function encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 180: 1939-1943.
- Klein, C., Kaletta, C. y Entian, K.D. 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 296-303.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M. y Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Knauth, S., Hurek, T., Brar, D. y Reinhold-Hurek, B. 2005. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology* 7: 1725-1733.
- Konopka, A. 2006. Microbial ecology: Searching for principles. *Microbe* 1: 175-179.
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A. y Tiedje, J.M. 2006. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7286-7293.
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Vater, J. y Borris, R. 2007. DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6953-6946.
- Kozdroj, J. y van Elsas, J.D. 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1405-1417.
- Kushwaha, C.P. y Singh, K.P. 2005. Crop productivity and soil fertility in a tropical dryland agro-ecosystem: Impact of residue tillage management. *Experimental Agriculture* 41:39-50.
- Kuske, C.R., Ticknor, O.L., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, J.M. y Belnap, J. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizosphere of three plant species and interspaces in an arid grassland. *Applied and environmental Microbiology* 4: 854-1863.

- Kuzyakov, Y., Raskatov, A. y Kaupenjohann, M. 2003. Turnover and distribution of root exudates of *Zea mays*. *Plant and Soil* 254: 317-327.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123:1-22.
- Landa, B.B. 1999. Control biológico de la fusariosis vascular del garbanzo mediante antagonistas microbianos. Tesis Doctoral. Departamento de Agronomía. Universidad de Córdoba. España. 527 pgs.
- Landa, B.B., Jiménez-Díaz, R.M., y Navas-Cortés. 2009. Control de Enfermedades Causadas por Microorganismos. En: Gómez-Calero J.A. (ed.). Sostenibilidad de la producción de olivar en Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, España, pgs. 225-266.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2003. Interactions between strains of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 93: 982-994.
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Raaijmakers J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2002. Differential ability of genotypes of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3226-3237.
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., Allende-Molar, R. y Weller, D.M. 2006. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 351-368.
- Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A. y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of Fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathology* 53: 341-352.
- Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Hervás, A. y Jiménez-Díaz, R.M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 91: 807-816.
- Larrainzar, E., O'Gara, F. y Morrissey, J.P. 2005. Applications of autofluorescent proteins for *in situ* studies in microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 59: 257-277.
- Laubert, C.L., Hamady, M., Knight, R. y Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5111-5120.
- Levin, A.G., Lavee, S. y Tsrur, L. 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology* 52: 212-218.

- Lewis, K., Whipps, J.M. y Cooke, R.C. 1989. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandum* as an antagonist. En: Whipps, J.M. y Lumsdem, R.D. (eds.). Cambridge University Press. Cambridge, pgs. 191-217.
- Ley, R.E., Harris, J.K., Wilcox, J., Spear, J.R., Miller, S.R. y Bebout, B.M. 2006. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hyper saline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3685-3695.
- Lisboa, M.P., Bonatto, D., Henriques, J.A.P. y Brandelli, A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* 9: 111-118.
- Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z. y Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49: 277-285.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. y Fomey, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Lodewyckx C., Taghavi, S., Mergeay, M., Vangonsveld, J., Clijster, H. y van der Lelie, D. 2000. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation* 3: 173-187.
- Long, H.H., Sonntag, D.G., Schmidt, D.D. y Baldwin, I.T. 2010. The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuate* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. *New Phytologist* 185: 554-567.
- López-Bueno, A., Tamames, J., Velázquez, D., Moya, A., Quesada, A. y Alcami, A. 2009. High diversity of the viral community from an Antarctic Lake. *Science* 326: 858-861.
- López-Escudero, F.J. y Blanco-López, M.A. 2001. Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Disease* 85: 489-496.
- Lottmann, J., Heuer, H., Smalla, K. y Berg, G. 1999. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 365-377.
- Loudet, O., Gaudon, V., Trubuli, A. y Danie-Vedele, F. 2005. Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 742-753.
- Lugtemberg, B. y Kamilova, F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556.

- Lupwayi, N.Z., Rice, W.A. y Clayton, G.W. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1733-1741.
- Marilley, L. y Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology* 13: 127-136.
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R. y Crowley, D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1437-1445.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D. y Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10: 1571-1581.
- Mavrodi, O.V., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2007. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the plant rhizosphere by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5531-5538.
- Mavrodi, O.V., McSpadden-Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. y Thomashow, L.S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology* 91: 35-43.
- Mazzola, M. Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M. y Pierson III, L.S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *Pseudomonas* in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2616-2624.
- Mazzola, M. y Gu Y.-H. 2002. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-5 and AG-8. *Phytopathology* 92: 1300-1307.
- Mazzola, M., Funnell, D.L. y Raaijmakers, J.M. 2004. Wheat cultivar-specific selection of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. *Microbial Ecology* 40: 43-56.
- McCain, A.H., Raabe, R.D. y Wilhelm, S. 1981. Plants resistant or susceptible to Verticillium wilt. Cooperative Extension, U.S. Department of Agriculture, University of California, Berkeley.
- McSpadden-Gardener, B.B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94: 1252-1258.

- McSpadden-Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology* 91: 44-54.
- Mechri, B., Mariem, F.B., Baham, M., Elhadj, S.B. y Hammami, M. 2008. Change in soil properties and the soil microbial community following land spreading of olive mill wastewater affects olive trees key physiological parameters and the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 152-161.
- Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A., Araujo, W.I. y Raijmakers, J.M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7259-7267.
- Mercado-Blanco, J. y Bakker, A.H.M.P. 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: Exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 367-389.
- Mercado-Blanco, J., Collado-Romero, M., Parrilla-Araujo, S., Rodríguez-Jurado, D. y Jiménez-Díaz, R.M. 2003b. Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 91-105.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A. y Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Suppression of *Verticillium* wilt planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control* 30: 476-486.
- Meredith, L., Biedrzycki, L. y Bais, H.P. 2009. Root secretions: From genes and molecules to microbial associations. *Journal of Experimental Botany* 6: 1533-1534.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P. y Colón-Carmona, A. 2009. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany* 60: 1729-1742.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H. y Tebbe, C.C. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology* 41: 43-56.
- Milgroom, J., Gómez, A., Soriano, M.A. y Fereres, E. 2007. From experimental research to an on-farm tool for participatory monitoring and evaluation: An assessment of soil erosion risk in organic olive orchards. *Land Degradation & Development* 18: 397-411.
- Milgroom, J., Soriano, M.A., Garrido, J.M., Gómez, J.A. y Fereres, E. 2006. Influence of the shift from conventional organic olive farming on soil management and erosion risk

- in Southern Spain. Renewable Agriculture and Food Systems doi: 10.107/RAF2006150.
- Miller, S.H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J.P. y O'Gara, F. 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology Reports 2: 403-411.
- Mizumoto, S. y Shoda, M. 2007. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation response surface methodology. Applied Microbiology and Biotechnology 76: 101-108.
- Mol, L. y Scholte, K. 1995. Formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb. on various plant part of two potato cultivars. Potato Research 38:143-150.
- Morales-Sillero, A., Fernández, J.E., Ordovás, J., Pérez, A., Liñan, J., López, E.P., Girón, I. y Troncoso, A. 2009. Plant-soil interactions in a fertigated "Manzanilla de Sevilla" olive orchard. Plant Soil 319: 147-162.
- Moreno, B., Gracia-Rodríguez, S., Cañizares, R., Castro, J. y Benítez, E. 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. Agriculture, Ecosystem & Environment 131: 333-339.
- Mule, R., Fodale, A.S. y Tucci, A. 2002. Control of olive *Verticillium* wilt by trunk injection with different doses of fosetyl-AI and benomyl. Acta Horticulturae 586: 761-764.
- Muleta, D., Assefa, F., Hjoort, K., Roos, S. y Granhall, U. 2009. Characterization of rhizobacteria isolated from wild *Coffea arabica* L. Engineering in Life Sciences 9: 100-108.
- Nagórska, K., Bilkowski, M. y Obuchowsky, M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica 54: 495-508.
- Navarro, C. y Parra, M. A. 2008. Plantación. En: D. Barranco, R. Fernández-Escobar y Rallo, L. (eds.). El cultivo del olivo. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, pgs. 191-238.
- Navarro, C., Fernández-Escobar, R. y Benlloch, M. 1992. A low-pressure, trunk-injection method for introducing chemical formulations into olive trees. Journal of the American Society of Horticultural Science 117: 357-360.
- Nybore, O., Brandt, K.K., Nicolaisen, M.H. y Sørensen, J. 2007. Methods to detect and quantify bacteria in soil. En: van Elsas J.D., Janson J.K. y Trevors J.D. (eds.) Modern Soil Microbiology -second edition, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pgs. 283-316.

- Oerke E.C. y Dehne H.W. 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* 23: 275-285.
- Oger, P., Mansouri, H. y Dessaux, Y. 2000. Effect of crop rotation and soil cover on alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines. *Molecular Ecology* 9: 881-890.
- Ongena, M. y Jacques, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *TRENDS in Microbiology* 16: 115-126.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A. y Thonart, P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:29-38.
- Oros-Sichler, M., Costa, R., Heuer, H. y Smalla, K. 2007. Molecular fingerprinting techniques to analyze soil microbial communities. En: van Elsas J.D., Janson J.K. y Trevors J.D. (eds) *Modern Soil Microbiology -second edition*, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pgs. 355-386.
- Oscáriz, J.C. y Pisabarro, A.G. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements of food safety and quality. *Biochimie* 84: 593-604.
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. y Minz, D. 2001. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3426-3433.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Palese, A.M., Pasquale, V., Celano, G., Figliuolo, G., Masi, S. y Xiloyannis, C. 2009. Irrigation of olive groves in southern Italy with treated municipal wastewater: Effects on microbiological quality of soils and fruits. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 129: 43-51.
- Pastor, M. 2008. Sistemas de manejo del suelo. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. (eds). 6ª Ed. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid España, pgs. 239-125.
- Pegg, G. F. y Brady, B. L., 2002. *Verticillium Wilts*. Wallingford, UK: CAB International. 552 pgs..
- Peyvandi, M., Farahani, F., Mazinani, M.H., Noormohamadi, Z., Ataii, S. y Asgharzade, A. 2010. *Pseudomonas* fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International Journal of Plant Production* 4: 63-66.

- Picard, C. y Bosco, M. 2003. Genetic diversity of *phlD* gene from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. strains from the maize rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters* 219: 167-172.
- Pignatelli, M., Moya, A. y Tamames, J. 2009. EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environmental Microbiology Reports* 1: 191-197.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I.B., Verneuli, B. y Urdaci, M.C. 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Research in Microbiology* 153: 269-276.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. y Sa, T. 2006. Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown chinese cabbage *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. *Plant Soil* 286: 167-180.
- Porazinska DL, Sung W, Giblin-Davis RM, Thomas WK. 2009. Reproducibility of read numbers in high-throughput sequencing analysis of nematode community composition and structure. *Molecular Ecology Resources* doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02819.x.
- Porras-Piedra, A., Martín, M.L.S., Soriano, A.P. e Izquierdo, G.F. 2005. Influence of arbuscular mycorrhizas on the growth rate of mist-propagated olive plantlets. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3: 98-105.
- Prieto, P., Navarro-Raya, C., Valverde-Corredor, A., Amyotte, S.G., Doblinson, K.F. y Mercado-Blanco, J. 2009. Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its *in planta* interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microbial Biotechnology* 2: 499-611.
- Prosser, J.I., Bohannan, B.J.M., Curtis, T.P., Ellis, R.J., Firestone, M.K., Freckleton, R.P., Green, J.L., Green, L.E., Killhan, K., Lennon, J.J., Osborn, A.M., Solan, M., van der Gast, C.J. y Young, P.W. 2007. Essay- the role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5: 384-392.
- Raaijmakers, J.M., Hayes, K., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 1999. Diversity and rhizosphere competence of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* strains. *Phytopathology* 89: S63.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinbergh, C., Alabouvette, C. y Moëne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321: 341-361.
- Raaijmakers, J.M., van der Sluis, I., Koster, M., Bakker, P.A.H.M., Weisbeek, P.J. y Schippers, B. 1995. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere

- competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. Canadian Journal of Microbiology 41: 126-135.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. y de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 81: 537-547.
- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M. y Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. Applied and Environmental Microbiology 63: 881-887.
- Rabbinge, R. 1993. The ecological background of food production. En: Ciba Foundation (ed.). Crop Protection and Sustainable Agricultura. Cia simposium 177. Wiley, Chichester, pgs. 2-29.
- Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J. y Trujillo, I. 2005. Variedades de olivo en España. Ed. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Ranjard, L., Poly, F. y Nazaret, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. Research in Microbiology 151: 167-177.
- Rasche, F., Hödl, V., Poll, C., Kandeler, E., Gerzabek, M.H., vanm Elsas J.D. y Sessitch A. 2006. Impact of transgenic potatoes expressing antibacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. Journal of Applied Ecology 43:555-566.
- Raubuch, M., Roose, K., Wamstorff, K., Wichem, F. y Joergensen, R.G. 2007. Respiration pattern and microbial use of field-grown transgenic Bt-maize residues. Soil Biology & Biochemistry 39:2380-2389.
- Reche, I., Ortega-Retuerta, E., Romera, O., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R. y Casamayor, E.O. 2009. Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs. Limnology and Oceanography 54: 869-879.
- Ridder-Duine, A.S., Kowalchuk, G.A., Paulien, J.A., Gunnewiek, K., Smant, W., van Veen, A.J. y de Boer, W. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. Soil Biology & Biochemistry 37: 349-357.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M. y Handelsman, J. 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. Environmental Microbiology 6: 981-989.
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M. y Kent, A.D. 2007a. Ecological control analysis: Being(s) in control of mass flux and metabolite

- concentrations in anaerobic degradation processes. *Environmental Microbiology* 9: 500-511.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, A.K., Hadwin, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G. y Triplet, E.W. 2007b. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology Journal* 1: 283-290.
- Röling, F.M.W. 2007. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 202-210.
- Romero, D., Pérez-García, A., Rivera, M.E., Cazorla, F.M. y de Vicente, A. 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbita powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 263-269.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. y Nyren, P. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* 242: 84-89.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L. y Bais, H.P. 2008b. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbial Ecology* 64: 153-166.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Pare, P.W. y Bais, H.P. 2008a. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology* 148: 1547-1556.
- Rumberger, A. y Marschner, P. 2003. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 445-452.
- Rumberger, A., Merwin, A.I. y Thies, E.J. 2007. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1645-1654.
- Rumberger, A., Yao, S., Merwin, I.A., Nelson, E.B. and Thies, J.E., 2004. Rootstock genotype and orchard replant position rather than soil fumigation or compost amendment determine tree growth and rhizosphere bacterial community composition in an apple replant soil. *Plant and Soil* 264: 247:260.
- Ryan, R. P., Dessaux, Y., Thomashow, L.S. y Weller, D.M. 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil* 321: 363-383.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. y Dowling, D.N. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.

- Salvaudon, L.G.T. y Shikoff, J.A. 2008. Genetic diversity in natural populations a fundamental component of plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 135-143.
- Sari, E., Etebarian, H.R. y Aminian, H. 2007. The effects of *Bacillus pumilus*, isolated from wheat rhizosphere, on resistance in wheat seedling roots against the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Phytopathology* 155: 720-727.
- Sari, E., Etebarian, H.R., Roustaei, A. y Aminian, H. 2006. Biological control of *Gaeumannomyces graminis* on wheat with *Bacillus* spp. *Plant Pathology Journal* 5: 307-314.
- Sassalaou, L.P., Markakis, E.A., Tjamos, S.E., Antonoiu, P.P., Paplomatas, E.J. y Tjamos, E.C. 2009. Biological control of Verticillium wilt of olive trees by using the biocontrol agent *Penibacillus alvei* K-165. *Phytopathologia Mediterranea* 48:348.
- Schallmach, E., Minz, D. y Jurkevitch, E. 2000. Culture-independent detection of shifts occurring in the structure of root-associated bacteria populations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) following nitrogen depletion. *Microbial Ecology* 40: 309-316.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. y Jackson, M.A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94:1267-1271.
- Schmidt, T.M. 2006. The maturing of microbial ecology. *International Microbiology* 9: 217-223.
- Schnathorst, W.C. y Mathre, D.E. 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology* 56: 1155-1161.
- Simon, C. y Rolf, D. 2009. Achievements and new knowledge unravelled by metagenomic approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 265-276.
- Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M. y Millard, P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* 147-155.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. y Berg, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4742-4751.
- Sofo, A., Palese, A.M., Casacchia, T., Celano, G., Ricciuti, P., Curci, M., Crecchio, C. y Xiloyannis C. 2010. Genetic, functional, and metabolic responses of soil microbiota in a sustainable olive orchard. *Soil Science* 175: 81-88.

- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, D.S.M. y Neal, P.R. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the unexplored 'rare biosphere'. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 103: 12115-12120.
- Sommaruga, R. y Casamayor, E.O. 2009. Bacterial 'cosmopolitanism' and importance of local environmental factors for community composition in remote high-altitude lakes. *Freshwater Biology* 54:994-1005.
- Sorensen, J. y Sessitch, A. 2007. Plant-associated bacteria---Lifestyle and molecular interactions. En: van Elsas, J.D., Janson J.K. y Trevors J.D. (eds.) *Modern Soil Microbiology* -second edition, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pgs. 211-236.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56: 845-857.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. y Song, A. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S r DNA sequence analysis. *Microbial Ecology* 55: 415-424.
- Tamames, J. y Moya, A. 2008. Estimating the extent of horizontal genes transfer in metagenomic sequences. *BMC Genomics* 9: 136-149.
- Tamames, J., Abellán, J.J., Pignatelli, M., Camacho, A. y Moyá, A. 2010. Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiology* 10: 85-99.
- Thies, J.E. 2007. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Science Society of America* 71: 579-591.
- Tjamos, E.C. y Jiménez-Díaz, R. M. 1998. Management of disease. En: Hiemstra, J.A. y Harris, D.C. (eds.). *A compendium of Verticillium wilt in trees*. Posen and Looijen, Wageningen, The Netherlands, pgs. 55-57.
- Tjamos, E.C., 1993. Prospects and strategies in controlling verticillium wilt of olive. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 23: 505-512.
- Torsvik, V. y Ovreas, L. 2007. Microbial phylogeny and diversity in soil. En: van Elsas J.D., Janson J.K. y Trevors J.D. (eds.) *Modern Soil Microbiology* -second edition, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pgs 23-54.
- Trapero, A. y Blanco, M.A. 2008. Enfermedades. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R y Rallo, L. (eds). 6ª Ed. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid España, pgs. 595-656.
- Tringle, S.G. y Hugenholtz, P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 11: 442-446.

- Van Elsas, J.D., Costa, R., Jansson, J., Sjöling, S., Bailey, M., Nalin, R., Vogel, T.M. y van Overbeek, L. 2008. The metagenomics of disease-suppressive soils – experiences from the Metacontrol Project. *Trends in Biotechnology* 26: 591-601.
- Van Elsas, J.D., Turner, S. y Bailey, M.J. 2003. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist* 157: 525-537.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., y Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-486.
- Van Overbeek, L. y van Elsas, J.D. 2008. Effect of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 64: 283-296.
- Van Overbeek, L.S., Bergervoet, J.H.H., Jacobs, F.H.H. y van Elsas, J.D. 2004. The low-temperature-induced viable-but nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94: 463-469.
- Vargas-Ayala, R., Rodríguez-Kaban, R., Morgan-Jones, G., McInroy, J.A. y Kloepper, J.W. 2004. Shifts in soil microflora induced by vevetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root knot nematodes. *Biological Control* 17: 11-22.
- Vassilev, N., Vassileva, M. y Nikoleva, I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: Potential and future trends. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 137-144.
- Vicre, M., Santaella, C., Blanchet, S., Gateau, A. y Driouich, A. 2005. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology* 138: 998-1008.
- Villalobos, F.J., Testi, L., Hidalgo, J., Pastor, M. y Orgaz, F. 2006. Modelling potential growth and yield of olive (*Olea europaea* L.) canopies. *European Journal of Agronomy* 2:296-303.
- Visser, S. y Parkinson, D. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7: 33-37.
- Von Tersch, M.A. y Carlton, B.C. 1983. Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213: Comparative studies with megacin A-216. *Journal of Bacteriology* 155: 866-871.
- Walker, J.J. y Pace, R.N. 2007. Endolithic microbial ecosystems. *Annual Review of Microbiology* 61: 331-347.
- Wang, G.Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R.J. y Davies, J. 2000. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Organic Letters* 2: 2401-2404.

- Wang, H., Peixia, J., Yuan, L., Zhiyong, R., Ruibo, J., Xin-Hui, X., Kai, L. y Dong, W. 2009. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. *Biochemical Engineering Journal* 44: 119-124.
- Wang, Y., Li, Q., Shi, J., Lin, Q., Chen, X., Wu, W. y Chen, W. 2008. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a cooper accumulator and a non-accumulator. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1167-1177.
- Ward, D.M., Bateson, M.M., Weller, R. y Ruff-Roberts, A.L. 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Advances in Microbial Ecology* 12:219-286.
- Warembourg, F.R., Roumet, C. y Lafont, F. 2003. Differences in rhizosphere carbon-partitioning among plant species of different families. *Plant and Soil* 256: 347-357.
- Weisskopf, L., Le Bayon, R.C., Kohler, F., Page, V., Jossi, M., Gobat, J.M., Martinoia, E. y Aragno, M. 2008. Spatio-temporal dynamics of bacterial communities associated with two plant species differing in organic acid secretion: A one-year microcosms study on lupin and wheat. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1772-1780.
- Weller, D.M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 97: 250-256.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
- Wilson, E. O. 1988. *Biodiversity*. National Academy Press.
- Wilson, E. O. 2002. *El futuro de la vida*. Galaxia Gutenberg, Círculo de Lectores. Barcelona, España.
- Woese, C.R. 1994. There must be a prokaryote somewhere – microbiologist search for itself. *Microbiological Reviews* 58: 1-9.
- Wu, T., Chellemi, D.O., Graham, J.H., Martin, K.J. y Roskopf, E.N. 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microbial Ecology* 55: 293-310.
- Yang, C.H. y Crowley, D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 345-351.
- Young, J.M., Crawford, J.W., Nunan, N., Otten, W. y Spiers, A. 2008. Microbial distribution in soils: Physics and scaling. *Advances in Agronomy* 100: 81-121.
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. y Bertagnolli, B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 955-963.

Zhang, H., Huang, Y., Ye, X., Shi, L. y Xu, F. 2009. Genotypic differences in phosphorus acquisition and the rhizosphere properties of *Brassica napus* in response to low phosphorus stress. *Plant and Soil* 320: 91-102.

Zohary, D. y Spiegel-Roy, P. 1975. Beginnings of fruit growing in the old World. *Science* 187: 319-327.

