

## Tesis doctoral

### *Caracterización de cepas de Bradyrhizobium de leguminosas arbustivas ibéricas. Implicaciones ecológicas de la interacción planta-microorganismo.*

En los ecosistemas de tipo mediterráneo la producción primaria está limitada por el estrés estival, caracterizado por la sequía y altas temperaturas, y por la baja disponibilidad de nutrientes. En este escenario la interacción con microorganismos de la rizosfera es clave para el desarrollo óptimo de las especies vegetales. La asociación que se establece entre leguminosas y rizobios cobra, por tanto, una especial relevancia en este entorno ya que permite el establecimiento y crecimiento de estas especies sobre suelos muy pobres en nitrógeno. En esta asociación simbiótica se desarrollan unas estructuras especiales, los nódulos, en las raíces de las leguminosas donde los rizobios realizan la fijación del nitrógeno atmosférico a compuestos utilizables por la planta. En los últimos años el aislamiento de los rizobios asociados a leguminosas no cultivadas ha desvelado una diversidad mucho mayor de la esperada, que refleja la complejidad de los ecosistemas naturales. Por otra parte, aunque una característica importante de la simbiosis rizobios-leguminosas es su especificidad, existen distintos grados de promiscuidad simbiótica dependiendo de las especies consideradas. En este sentido, las leguminosas altamente promiscuas parecen poseer una gran capacidad colonizadora.

Las especies caméfitas y fanerófitas pertenecientes a la familia Fabaceae constituyen formaciones vegetales ampliamente distribuidas en la Península Ibérica, que sustituyen en muchos casos al arbolado y desempeñan parcialmente sus funciones. Sin embargo, a pesar de la abundancia y extensión de las formaciones de matorral de leguminosas en nuestro entorno, existen pocos datos sobre la asociación simbiótica entre rizobios y dichas especies arbustivas. Por ello en el presente trabajo hemos abordado el aislamiento de bacterias formadoras de nódulos en seis leguminosas arbustivas autóctonas ampliamente distribuidas en el oeste

#### Tesis doctoral

##### Autor:

Susana Rodríguez  
Echeverría

##### Director:

María A. Pérez Fernández

##### Centro:

Universidad de Salamanca

##### Fecha de lectura:

24 Junio 2002

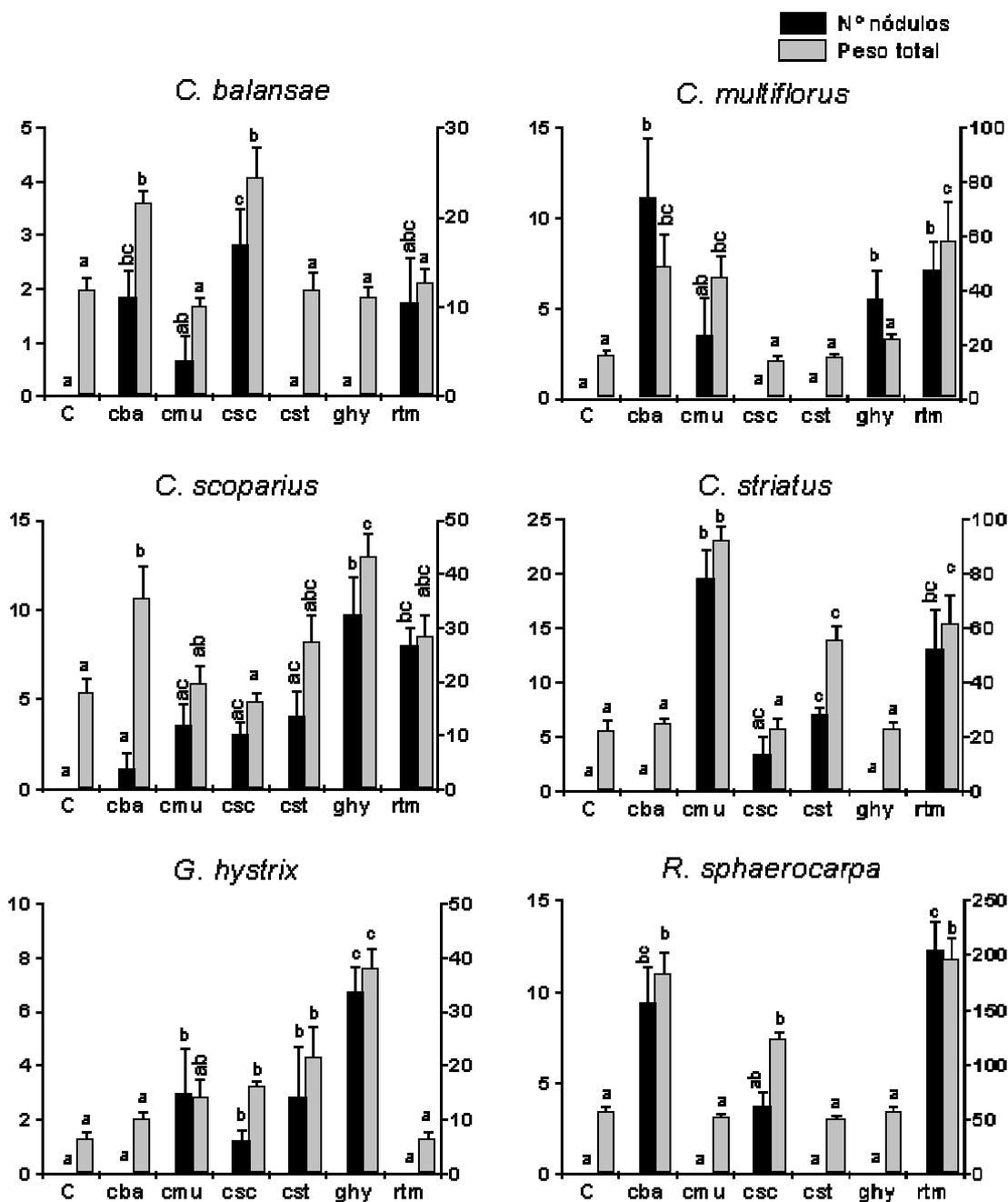


Foto 1. Formación de *Cytisus multiflorus*

peninsular, *Cytisus balansae* (Boiss.) Ball, *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet, *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Cytisus striatus* (Hill) Rothm, *Genista hystrix* Lange y *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. Asimismo, se procedió al estudio de la promiscuidad simbiótica para estas especies y para especies alóctonas procedentes del Oeste de Australia, *Daviesia horrida* Preiss ex Meissner, *Bossiaea aquifolium* Benth., *Gastrolobium spinosum* Benth., *Gompholobium tomentosum* Labill., *Jacksonia floribunda* Endl. y *Templetonia retusa* (Vent) R. Br., analizando el potencial invasor de éstas de suelos ibéricos ocupados por leguminosas arbustivas autóctonas. Como punto final, se analizó el papel de esta simbiosis en formaciones naturales de *R. sphaerocarpa* y *C. striatus* haciendo hincapié en la posible transferencia del nitrógeno fijado en dicha simbiosis a especies próximas de leguminosas.

Las bacterias aisladas de nódulos radicales de las especies ibéricas mencionadas son rizobios de crecimiento lento. El análisis de su huella genética mediante PCR demostró que los seis aislamientos corresponden a seis nuevas cepas diferentes entre sí y de las tres especies válidas descritas para *Bradyrhizobium*. La construcción del árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gen 16S rDNA confirmó su pertenencia al género *Bradyrhizobium* y las agrupó en dos bloques diferentes, las cepas cba, csc y rtm por un lado; y ghy, cst y cmu por otro. Hay que destacar que las cepas cba y csc en el primer caso, y cst y ghy en el segundo presentan una mayor cercanía genética.

La inoculación de plántulas de las seis especies de leguminosas ibéricas seleccionadas con las seis cepas de *Bradyrhizobium* reveló una alta promiscuidad simbiótica tanto desde el punto de vista de la infectividad como de la efectividad. Los patrones de infectividad fueron diferentes para cada una de las especies consideradas. Cada especie vegetal desarrolló, como mínimo, dos asociaciones simbióticas efectivas, aunque la más promiscua fue *C. scoparius* que desarrolló nódulos en los seis tratamientos de inoculación. El caso de *R. sphaerocarpa* destaca porque todas las simbiosis establecidas por esta especie fueron efectivas. Tanto las cepas rizobianas como las especies de leguminosas obtenidas presentan por tanto una cierta promiscuidad simbiótica. Estos resultados indican, por un lado, que las relaciones simbióticas en sistemas naturales son altamente complejas y, por otro, ponen de manifiesto la utilidad de la inoculación rizobiana en proyectos de revegetación con las especies vegetales seleccionadas (**Figura 1**).



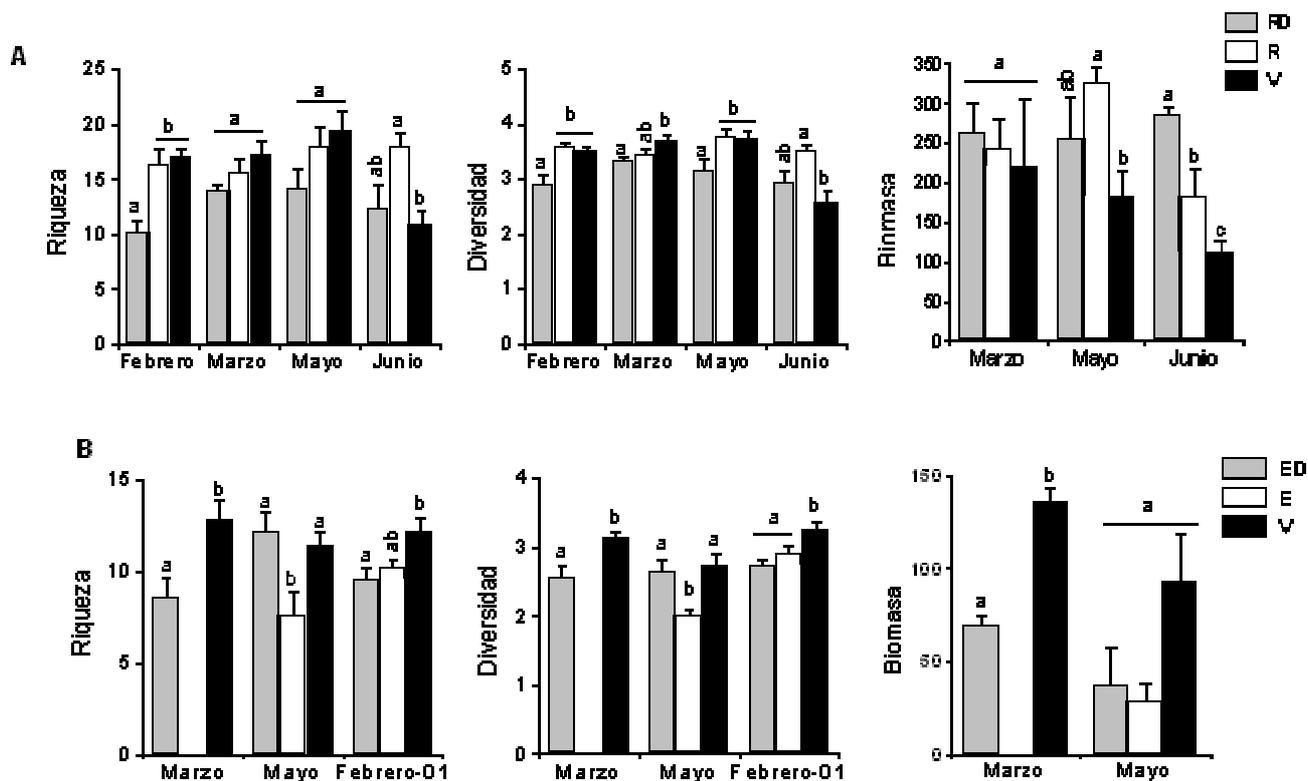
**Figura 1.** Número medio de nódulos, representado en el eje Y derecho, y biomasa total producida (mg), representada en el eje Y izquierdo, para las seis especies vegetales mencionadas en los tratamientos de inoculación. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos para ambas variables, tras ANOVA de una vía y test de Tukey.

Para analizar si la promiscuidad simbiótica es una característica extendida entre las especies arbustivas de clima mediterráneo utilizamos seis especies alóctonas que fueron sembradas sobre suelos de la Península Ibérica e inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium* obtenidas en este trabajo. En este experimento también se evaluó la importancia de la microbiota edáfica sobre el crecimiento vegetal de especies autóctonas y alóctonas. Los resultados obtenidos en este experimento se resumen en:

- La falta de microorganismos edáficos tuvo un efecto negativo sobre la nodulación y el crecimiento de las especies autóctonas pero dicho efecto no fue tan acusado sobre las especies alóctonas. Este resultado pone de manifiesto la existencia de relaciones de tipo positivo entre la vegetación y la microbiota de los suelos donde ésta se asienta. Además el establecimiento de estas relaciones depende de procesos de tipo coevolutivo ya que son más importantes para especies del mismo entorno.
- Cuatro especies alóctonas, *B. aquifolium*, *G. spinosum*, *G. tomentosum* y *J. floribunda* desarrollaron simbiosis efectivas en los suelos de la Península Ibérica. La promiscuidad simbiótica parece ser por tanto una característica común para leguminosas leñosas procedentes de zonas de clima mediterráneo.
- Las especies alóctonas crecieron mejor en los suelos procedentes de formaciones de matorral dominadas por *C. balansae* y *G. hystrix* que en los otros cuatro suelos analizados. En los dos primeros casos algunas especies australianas desarrollaron una biomasa mayor que la producida por las especies autóctonas. Estos suelos presentarían, por tanto, una mayor vulnerabilidad a la invasión por especies de leguminosas alóctonas.

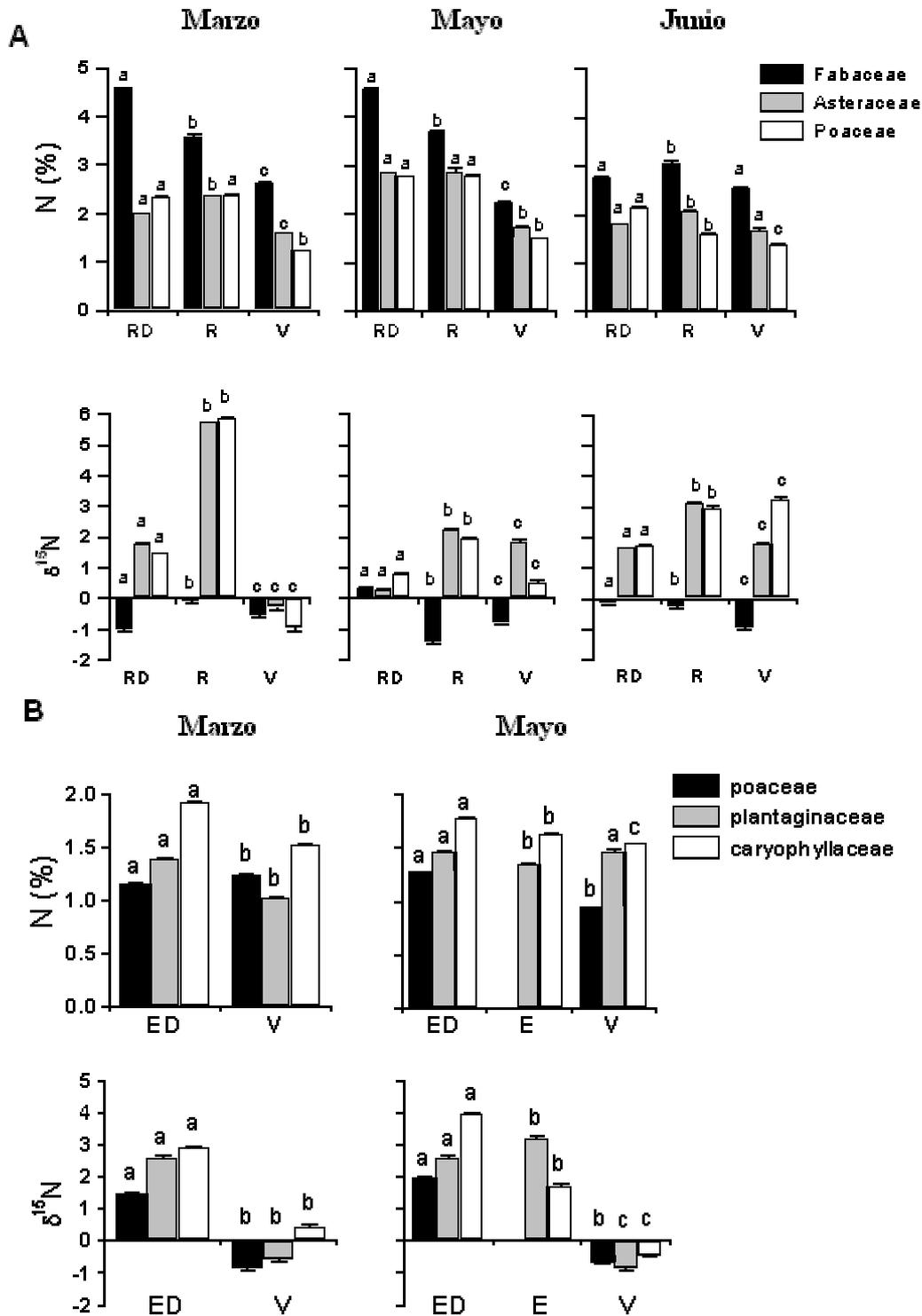
La parte final de este trabajo evaluó los efectos derivados de la presencia de *R. sphaerocarpa* y *C. striatus* sobre la fertilidad edáfica y la comunidad herbácea, haciendo hincapié en los efectos derivados de la fijación de nitrógeno en los nódulos radicales de dichas especies. Los sitios de estudio estuvieron situados en la provincia de Badajoz, concretamente en Barcarrota (pH entre 6 y 7, clima mesomediterráneo seco según Rivas-Martínez) y en San Vicente de Alcántara (pH entre 3.8 y 4.5, clima mesomediterráneo subhúmedo) respectivamente. En cada una de estas formaciones se dispusieron cuatro parcelas experimentales, correspondientes a un estrato arbustivo denso (RD y ED), un solo arbusto (R y E), vegetación herbácea sin estrato arbustivo (V) y suelo desnudo (S).

La riqueza y diversidad herbáceas fueron menores en las parcelas con estrato arbustivo en ambas formaciones de matorral (**Figura 2**). Sin embargo, la heterogeneidad espacial creada por la presencia del matorral permitió la aparición de diferentes nichos que fueron ocupados por nuevas especies vegetales, provocando un incremento de la riqueza y diversidad totales de estas comunidades. La presencia de *R. sphaerocarpa* tuvo un efecto facilitador sobre el crecimiento de las especies herbáceas situadas bajo su copa, que fue más acusado en el mes de junio, es decir, bajo las condiciones ambientales más estresantes. Este efecto facilitador no fue observado para *C. striatus*, probablemente debido a la menor disponibilidad lumínica e hídrica bajo su copa respecto a la de *Retama* (**Figura 2**). El efecto facilitador del matorral descrito en zonas de clima árido y semi-árido es menor en nuestra zona de estudio, consecuencia directa de las diferentes condiciones ambientales. En estos enclaves el aumento de la fertilidad bajo la copa arbustiva podría conducir a un incremento de los fenómenos de competencia entre las especies herbáceas.



**Figura 2.** Riqueza, diversidad y biomasa ( $\text{g/m}^2$ ) del estrato herbáceo en la formación de *R. sphaerocarpa* (A) y *C. striatus* (B). Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre las parcelas tras ANOVA de una vía y test de Tukey.

En ambas formaciones, el contenido en nitrógeno de las especies herbáceas fue superior en las parcelas con matorral. El análisis del contenido isotópico en  $^{15}\text{N}$  no detectó una transferencia directa del nitrógeno fijado en los nódulos radicales de las leguminosas arbustivas a las especies herbáceas cercanas. Estos resultados revelan la mejora en la disponibilidad de este nutriente bajo la copa arbustiva, que sería el resultado de la descomposición de la hojarasca procedente de *R. sphaerocarpa* y *C. striatus* rica en nitrógeno debido a la simbiosis con rizobios realizada por estas especies (**Figura 3**).



**Figura 3.** Contenido en nitrógeno y  $\delta^{15}\text{N}$  para las especies herbáceas de las familias botánicas indicadas en cada tipo de parcela y mes de muestreo en la formación de *R. sphaerocarpha* (A) y *C. striatus* (B). Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre las parcelas tras ANOVA de una vía y test de Tukey.