

UCH-FC
MAG-B
R 397
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y METABÓLICA DE LOS
ENSAMBLES BACTERIANOS ASOCIADOS A RAÍCES
PROTEOIDEAS DE *Embothrium coccineum*”**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Ciencias

Por

LAURA GUADALUPE RENDEROS REYES

2017

Directores de Tesis:
DRA. JULIETA ORLANDO
DRA. MARGARITA CARÚ
DRA. ALEJANDRA ZÚÑIGA

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

LAURA GUADALUPE RENDEROS REYES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 del mes mayo del año 2017.

Directores de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Dra. Margarita Carú

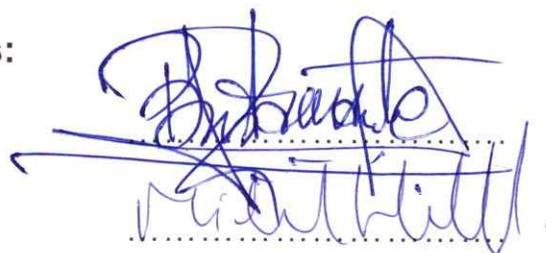
Dra. Alejandra Zúñiga



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Ramiro Bustamante

Dr. Michael Handford



Al apoyo incondicional de mis seres queridos, por nunca dejarme sola...



RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací el 30 de abril de 1985, en un país de Centroamérica, El Salvador, un país que a pesar de ser chiquitito, es muy rico en biodiversidad, y así crecí rodeada de animales y plantas, en una familia que me enseñó el amor y el respeto hacia ésta. Posteriormente ingresé a la universidad estatal, Universidad de El Salvador, donde estudié la carrera de Biología y me interesé por la micología, en especial la interacción hongo-planta, por lo cual hice mi tesis de pregrado en una descripción de micorrizas arbusculares en un área natural protegida. Durante todo ese tiempo, a pesar de las limitantes académicas, el paso por la universidad me inculcó la curiosidad y me permitió darme cuenta que era necesario seguir formándome para poder responder a tanta necesidad en mi país. Luego, gracias a la universidad de El Salvador, y el Laboratorio de Conservación Biológica, realicé una pasantía en la Universidad de Chile, que abrió las puertas a la oportunidad de seguir mi perfeccionamiento profesional, ahora en el Laboratorio de Ecología Microbiana, donde realicé mi tesis de Magister.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a mi familia, por haberme dado la oportunidad de seguir formándome, de siempre inculcar que no hay mejor riqueza que la del conocimiento. A mi papá por siempre ser tan esforzado por proveer y hacernos sentir seguras de que nunca nos faltaría nada, a mi mamá que con tanto amor y cariño siempre nos aconseja que no hay límites si nos lo proponemos, a mi hermana por ser incondicional a cada ocurrencia que se me cruzaba por la mente, a mi tía por ser más que tía una hermana y siempre que necesité algo estar siempre pendiente.

Agradezco a mis profesoras, Juli, por aguantar a su oveja negra, con tendencias a desaparecer y dislexia, por abrirme las puertas al laboratorio de Ecología Microbiana sin mayor duda ni complicación, por confiar en mí, a pesar de los vacíos que ella sabía que tenía, y no dudar que podría salir de todos los obstáculos que esta maestría podría tener; de forma personal, creo que confía más en mí que yo misma, porque definitivamente es una profe estupenda. A la jefa, la profe Margarita, por sus consejos, correcciones, tiempo dedicado a mí y a este laboratorio, por las bromas de los tomates y por ser un rol a seguir, como mujer de ciencia e investigadora.

A mi laboratorio, a Juanita de mi corazón, por ser tan preocupada, por siempre estar atenta a nuestras necesidades por los retos con *amorsh* cuando dejaba el mesón desordenado. A mis amigos, compañeros, camaradas, etc. del laboratorio, a los viejos y a los nuevos; a Vale, Cata Z., Marcos, que iniciaron conmigo esta estancia que parece breve si la veo para atrás, por ser amigos, por cuando tenía alguna duda siempre podía recurrir a ellos. A los de siempre, Dieguito, que fue una suerte de asignación para ver lo de la extracción de ADN, pero finalmente siempre podía recurrir a él con alguna duda; a mi queridísima María Camila, por ser tan incondicional y compartir conmigo todo, tragedias y alegrías durante todo este tiempo. A los nuevos, a mi Ceci tan amorosa, uno se sorprende cuando no está buscando un amigo y se encuentra este tipo de

tesoros. Y a todos los chiquillos del Lab, Jaime, Liti, por hacer amenos cada una de nuestras celebraciones y a toodos los chiquillos que pasaron por el lab.

A todo el equipo de Valdivia, la profe Alejandra Zúñiga, por su tiempo y dedicación a este tema de investigación, a Mabel por apoyarme en la parte de terreno y todo lo relacionado con las *cluster roots*, a Felipe porque sin duda el terreno no hubiera sido tan fácil sin el presente y a todo el laboratorio de la profe que en algún momento nos colaboró.

A mi comisión, a los profesores Ramiro Bustamante y Michael Handford por ser tan pacientes, tomar con humor mis respuestas y tener la buena disponibilidad de irme guiando en todo este proceso de titulación.

A mis amigos lejanos y cercanos. A Vale Gar por mostrarme que podía encontrar amigas acá en Chilito, a mi Sol por apoyarme cuando más lo necesité, por escucharme, por reírnos como locas y reírte de todas las tonteras que te digo; a todos mis amigos salvadoreños en Chile, que han estado pendientes de mí, Caby, Caty, Vane, Cayito, Sari y los demás (estos son la comisión).

A Julio, por las catarsis a distancia, apoyo y consentimientos, a Ricardo José por todos los mensajes diarios, así como a Cecilia; espero compartir nuevamente con ellos, y todos mis amigos salvadoreños

Agradezco de manera especial al Profesor Javier Simonetti por abrirme las puertas a su laboratorio, por lo cual llegué a Chile, por sus consejos, su sabiduría y su enorme cariño.

Finalmente, a Silvio, sin duda, la razón por la cual estoy terminando este magister, motivándome, apoyándome, gracias por siempre ser mi pilar.

Infinitas gracias a todos...

Financiamiento: proyectos FONDECYT (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico) 1130440 (IR Dra. Zúñiga) y PAIFAC (Programa de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) 2016 (IR Dra. Orlando).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1. Área de estudio y recolección de las muestras de suelo	8
2.2. Parámetros edáficos	10
2.3. Estructura genética de los ensamblajes bacterianos	12
2.3.1. <i>Extracción de DNA y amplificación por PCR</i>	13
2.3.2. <i>Obtención de los fragmentos terminales de restricción</i>	14
2.3.3. <i>Análisis de los perfiles de TRFLP</i>	14
2.4. Estructura metabólica de los ensamblajes bacterianos	16
2.4.1. <i>Medición de la utilización de diferentes fuentes de carbono</i>	16
2.4.2. <i>Análisis de los perfiles de CLPP</i>	17
3. RESULTADOS	19
3.1. Análisis de parámetros edáficos	19
3.2. Caracterización de la estructura genética de los ensamblajes bacterianos	20
3.3. Caracterización de la estructura metabólica de los ensamblajes bacterianos	27
4. DISCUSIÓN	38
5. CONCLUSIONES	50
6. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de muestreo en las cercanías de la localidad de Valdivia.	8
Figura 2. Secciones radiculares representando los diferentes estadios de maduración de las raíces proteoideas.	10
Figura 3. Distribución de las 31 fuentes de carbono dispuestas en triplicado en las placas Ecoplate™ (BIOLOG®).	17
Figura 4. Parámetros edáficos medidos en las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS).	19
Figura 5. Frecuencia relativa de los fragmentos de restricción del gen del rRNA 16S de los ensamblajes bacterianos de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	21
Figura 6. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles genéticos (TRFLP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS).	22
Figura 7. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles genéticos (TRFLP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	24
Figura 8. Índices de diversidad de los perfiles genéticos (TRFLP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	26
Figura 9. Curvas de la cinética del consumo promedio de fuentes de carbono en las ecoplacas.	27
Figura 10. Parámetros cinéticos de las curvas de utilización de fuentes de carbono en las ecoplacas de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	28
Figura 11. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles metabólicos (CLPP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS).	30

Figura 12. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles metabólicos (CLPP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	32
Figura 13. Índices de diversidad de los perfiles metabólicos (CLPP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	35
Figura 14. Utilización de cada una de las fuentes de carbono de las ecoplaças. Panel superior: muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS).	36
Figura 15. Utilización de cada una de las fuentes de carbono de las ecoplaças. Panel superior: muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de carga de las variables explicativas para las dos primeras coordenadas del análisis de escalamiento multidimensional no métrico basado en la estructura genética (TRFLP).	23
Tabla 2. Coeficientes de determinación y la significancia de las comparaciones de acuerdo a ANOSIM, de los perfiles genéticos (TRFLP).	25
Tabla 3. Porcentajes de disimilitud de acuerdo a SIMPER de los perfiles genéticos (TRFLP).	25
Tabla 4. Valores de carga de las variables explicativas para las dos primeras coordenadas del análisis de escalamiento multidimensional no métrico basado en la estructura metabólica (CLPP).	31
Tabla 5. Coeficientes de determinación y la significancia de las comparaciones de acuerdo a ANOSIM, de los perfiles metabólicos (CLPP).	33
Tabla 6. Porcentajes de disimilitud de acuerdo a SIMPER de los perfiles metabólicos (CLPP).	34

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS

Al	aluminio
BS	suelo sin influencia de raíces
Ca	calcio
CH	contenido hídrico
CICE	capacidad de intercambio de cationes efectiva
CLPP	perfiles fisiológicos a nivel comunitario
H'	índice de diversidad de Shannon
J	índice de equidad
JCR	raíces proteoideas juveniles
K	potasio
MCR	raíces proteoideas maduras
Mg	magnesio
MO	materia orgánica
Na	sodio
NCR	raíces no proteoideas
NMDS	escalamiento multidimensional no métrico
N-NH ₄	nitrógeno del amonio
N-NO ₃	nitrógeno del nitrato
pH-H ₂ O	pH de extracto de suelo en agua
P-Olsen	fósforo Olsen
RS	suelo cercano a raíces
S	riqueza
SCR	raíces proteoideas senescentes
sSCR	raíces proteoideas semi-senescentes
TRFLP	polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción terminal

RESUMEN

Las raíces proteoideas son estructuras tipo "cepillo" o "racimo" que constituyen una estrategia de algunas plantas para aumentar la incorporación de nutrientes de baja disponibilidad desde el suelo a través de la liberación de exudados que contienen ácidos orgánicos y protones. Se sabe que los distintos exudados de las plantas, propios de cada especie, producen una selección que modifica la composición y diversidad microbianas. En particular, las raíces proteoideas afectarían las poblaciones microbianas al proveer nutrientes y un sustrato donde adherirse, proporcionando un microhábitat y por ende un aislamiento espacial que limita la competencia y que alojaría diversas poblaciones. En Chile se encuentran algunas especies de plantas que forman raíces proteoideas, entre ellas, *Embothrium coccineum* (Notro) es una especie endémica de América del Sur presente en distintos ecosistemas boscosos. Recientemente, se ha demostrado que la actividad microbiana evaluada en distintos tipos de raíces proteoideas aumenta en comparación con la del suelo alejado de las raíces y podría modificar la diversidad de los ensamblajes microbianos del suelo cercano a estas raíces. En esta Tesis se propuso comparar los ensamblajes bacterianos asociados a distintas zonas del sistema radicular de *E. coccineum*: (i) suelo no-rizosférico, (ii) suelo cercano a las raíces y (iii) suelo íntimamente asociado a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo. Se postula que, si bien el suelo no-rizosférico albergaría una

microbiota diferente a la de los suelos rizosféricos, las raíces proteoideas maduras tendrían un fuerte efecto de selección sobre la microbiota, el cual estaría asociado a una reducción del pH por la liberación de ácidos orgánicos. Para ello se determinaron los parámetros edáficos y la diversidad genética y metabólica de los ensamblajes bacterianos en los suelos asociados a las distintas zonas del sistema radicular de *E. coccineum*. Los resultados muestran que la acidificación fue mayor en el suelo cercano a las raíces de *E. coccineum* en comparación con el suelo sin influencia de las raíces, y aunque la disponibilidad de fósforo fue ligeramente mayor en la rizósfera que en el suelo sin influencia de raíces, no se observaron diferencias significativas. Adicionalmente, se encontró un aumento de nitrato, potasio y aluminio cercanos a las raíces de *E. coccineum*. Por otro lado, tanto a nivel genético como a nivel metabólico se observó una separación de los ensamblajes bacterianos de los suelos con y sin influencia de las raíces de *E. coccineum*, siendo más clara la separación a nivel metabólico. Los factores edáficos que tuvieron mayor influencia fueron el pH y el nitrato. Al incluir en los análisis multivariados los perfiles de los ensamblajes bacterianos de los suelos asociados a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas, los ensamblajes que más se diferenciaron del resto a nivel genético fueron las asociadas a las raíces proteoideas juveniles y a nivel metabólico el suelo sin influencia de las raíces. A este último nivel, el ensamblaje del suelo cercano a las raíces a su vez se separó con respecto a las asociadas a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas, siendo entre estos últimos las raíces proteoideas maduras y senescentes las que menos se

parecieron entre sí. Basado en los resultados, se concluye que *E. coccineum* disminuye el pH y aumenta el nitrato del suelo de su rizósfera, y que al inicio del desarrollo de sus raíces proteoideas, los ensamblajes bacterianos edáficos asociados cambian su estructura; mientras que durante el estadio maduro de desarrollo de sus raíces proteoideas, los ensamblajes bacterianos edáficos presentan una actividad metabólica potencial más homogénea.

ABSTRACT

Cluster roots are brush-like or bunch-like structures that constitute a strategy of some plants to increase the incorporation of low available nutrients from the soil through the release of exudates containing organic acids and protons. It is known that the different exudates of plants, specific to each species, produce a selection that modifies microbial composition and diversity. In particular, cluster roots affect the microbial populations by providing nutrients and a substrate to adhere to, providing a microhabitat and then a spatial isolation that limits competition and accommodates diverse populations. In Chile there are some plant species that form cluster roots. Among them, *Embothrium coccineum* (Notro) is an endemic species of South America present in different forest ecosystems. Recently, it has been demonstrated that the microbial activity evaluated in different types of cluster roots increases compared to that in the soil away from the roots and could modify the diversity of the microbial assemblages of the soil near these roots. In this Thesis, the bacterial assemblages associated to different zones of the *E. coccineum* root system: (i) non-rhizospheric soil, (ii) soil near roots and (iii) soil closely associated with cluster roots of different developmental stages were compared. We postulated that, although the non-rhizospheric soil would harbor a different microbiota from that of the rhizospheric soils, the mature cluster roots would have a strong selection effect on the microbiota, which would be associated with a reduction of pH by the release of

organic acids. For that, the edaphic parameters and the genetic and metabolic diversity of the bacterial assemblages in the soils associated with the different zones of the *E. coccineum* root system were determined. The results show that the acidification was higher in the soil near the roots of *E. coccineum* compared to the soil without root influence, and although the availability of phosphorus was slightly higher in the rhizosphere than in the soil without root influence, no significant differences were observed. Additionally, we found an increase of nitrate, potassium and aluminum near the roots of *E. coccineum*. On the other hand, at both genetic and metabolic levels was observed, a separation of the bacterial assemblages of the soils with and without influence of the roots of *E. coccineum*, being clearer the separation at the metabolic level. The edaphic factors that had greater influence were pH and nitrate. By including in the multivariate analyzes the profiles of the bacterial assemblages of the soils associated with the different developmental stages of the cluster roots, the assemblages that were most differentiated from the rest at the genetic level were those associated with the juvenile cluster roots and at the metabolic level the soil without influence of the roots. At this last level, the assemblage of the soil near the roots in turn was separated with respect to those associated to the different developmental stages of the cluster roots, being between the latter the mature and senescent cluster roots which were less similar to each other. Based on our results, we conclude that *E. coccineum* lowers pH and increases soil nitrate in its rhizosphere, and that at the beginning of the development of its cluster roots, the associated edaphic bacterial assemblages change their

structure; while during the mature stage of development of their cluster roots, the edaphic bacterial assemblages have a more homogeneous potential metabolic activity.

1. INTRODUCCIÓN

Las raíces proteoideas (en inglés *cluster roots*) son una modificación del sistema radicular en algunas plantas utilizada como una estrategia para aumentar la incorporación de nutrientes desde el suelo, especialmente en aquellos que presentan baja disponibilidad de fósforo (Lambers y col. 2006, 2010). Estas raíces se caracterizan por un aumento de las raicillas y pelos radiculares alrededor de la raíz central formando estructuras tipo "cepillo" o "racimo", las cuales se han descrito en plantas de la familia *Proteaceae* y algunos miembros de las familias *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Cucurbitaceae*, *Eleagnaceae*, *Leguminosae*, *Moraceae* y *Myricaceae* (Skene 2000). Las raíces proteoideas corresponden a estructuras efímeras, con una vida media de entre 20 y 30 días, donde ocurren tanto cambios anatómicos como metabólicos en su estructura, entre ellos una mayor tasa de exudación detectada en raíces proteoideas de estado maduro (Shane & Lambers 2005; Delgado y col. 2014).

En el suelo, el fósforo tiene en general baja movilidad debido a su sorción a la matriz. Por lo tanto, las plantas han desarrollado estrategias para obtener este nutriente, por ejemplo, a través de la asociación con hongos micorrícicos que ayudan en la captación de nutrientes, entre ellos nitrógeno y fósforo (Smith & Smith 2011). Sin embargo, la mayoría de las plantas con raíces proteoideas se caracterizan por la ausencia de micorrizas (Allsop & Stock 1993) y, hasta donde se ha observado, dichas raíces proteoideas se formarían sin la

intervención de microorganismos. Se ha sugerido que las especies de plantas con raíces proteoideas podrían compensar la deficiencia de fósforo mediante la formación de este tipo de raíces. Además, estas plantas pueden asociarse con otros microorganismos que podrían jugar un rol en la adquisición de nitrógeno (Stafford y col. 2005), es así como varias especies que forman raíces proteoideas son también capaces de formar nódulos radiculares por simbiosis con rizobios o *Frankia* (Neumann & Martinoia 2002).

Las raíces proteoideas exploran el suelo y se ubican en sectores donde existe una concentración alta de fósforo pero en un estado no biodisponible, debido a que ellas pueden extraerlo a través de sus exudados (Lambers y col. 2008, 2011) que contienen ácidos orgánicos y protones que alteran la química del suelo favoreciendo la solubilización de fósforo (Neumann y col. 2000; Neumann & Martinoia 2002; Lamont 2003).

Por otra parte, los distintos exudados de las plantas, propios de cada especie, también producen una selección que modifica la composición y diversidad microbiana del suelo rizosférico (Marschner y col. 2001; Haichar y col. 2008; Farías y col. 2009). Por lo tanto, las comunidades microbianas presentes en el suelo alejado a las raíces son significativamente diferentes de las comunidades rizosféricas, conteniendo estas últimas mayor biomasa microbiana y actividad metabólica debido a que la raíz es un hábitat más rico en nutrientes biodisponibles y con mayor humedad, lo que favorece el crecimiento y colonización de los microorganismos (Kent & Triplett 2002). En particular, las raíces proteoideas afectan las poblaciones microbianas al proveer nutrientes y

un sustrato donde adherirse, proporcionando micro-hábitats y un aislamiento espacial que limitan la competencia y que alojaría diversas poblaciones microbianas (Stafford y col. 2005). Asimismo, algunos estudios sugieren que las rizobacterias podrían tener algún rol en la formación y función de las raíces proteoideas (Lamont 2003; Lamont y col. 2014), aunque este aspecto resulta aún controversial.

En Chile se encuentran 6 especies de la familia *Proteaceae* que forman raíces proteoideas (Zúñiga-Feest y col. 2010, 2014; Delgado y col. 2014). Entre ellas se distingue *Embothrium coccineum* JR Forst. & G Forst. (Notro), una especie endémica de América del Sur que está presente en distintos ecosistemas boscosos, desde bosques lluviosos hasta bosques subantárticos (Donoso 2006). Notro muestra una alta tasa de colonización en suelos con baja disponibilidad de fósforo como los depósitos volcánicos (escoria y ceniza), morrenas glaciares, y bordes de caminos (Souto y col. 2009; Lambers y col. 2012; Delgado y col. 2015a). *E. coccineum* está descrita como una especie que carece de micorrizas (Godoy y col. 1994) y nódulos diazotróficos (Lambers y col. 2012), por lo tanto su estrategia para acceder al fósforo es mediante raíces proteoideas y sus exudados (Lambers y col. 2008; Zúñiga-Feest y col. 2010; Lambers y col. 2012), principalmente mediante la exudación de citrato y malato (Shane y col. 2003; Delgado y col. 2013; Delgado y col. 2014). Hasta ahora se sabe que la inhibición de estas raíces proteoideas ocurre a altas concentraciones de fósforo (Delgado y col. 2013; Delgado y col. 2014), pero también se ha sugerido que otros factores podrían influenciar su formación,

como la participación de microorganismos rizosféricos (Ramírez y col. 1990; Lamont y col. 2003; Lamont y col. 2014; Lamont & Pérez-Fernández 2016) y el contenido de nitrógeno en los tejidos (Piper y col. 2013).

Los antecedentes sobre el efecto de las raíces proteoideas y sus exudados sobre la composición, riqueza y abundancia de la microbiota rizosférica son escasos. Así también, el rol a nivel ecosistémico en el aumento de la disponibilidad de nutrientes como el fósforo aún no se ha dimensionado. Recientemente, Delgado y col. (2015a) mostraron que las raíces proteoideas pueden aumentar las formas más disponibles de fósforo para las plantas en suelos volcánicos del sur de Chile. Sin embargo, no se han evaluado las posibles modificaciones que podrían también estar ocurriendo en la microbiota de la rizósfera. En este contexto, en un estudio con plantas de *Lupinus albus* L. cv. Amiga (*Fabaceae*), se encontró que las raíces proteoideas maduras tiene un fuerte impacto sobre la microbiota del suelo resultando en una disminución de la riqueza y abundancia de las comunidades asociadas a estas estructuras radiculares, en comparación con aquellas que colonizan raíces proteoideas juveniles o no-proteoideas (Weisskopf y col. 2005). Esta última observación estaría asociada a la acidificación del suelo debida a una mayor excreción de ácidos orgánicos y protones que ocurre en los estados maduros de estos sistemas radiculares (Neumann & Martinoia 2002). Por lo tanto, se podría esperar una colonización microbiana diferencial de la raíz en respuesta a la concentración y tipo de exudados que presentan los distintos sectores de la raíz y/o los distintos estados de desarrollo de las raíces proteoideas. Sin embargo

se debe considerar que Weiskopf y col. (2005) concluyeron que la proximidad a la raíz tuvo un mayor efecto sobre la microbiota del suelo que el estadio de desarrollo de las raíces proteoideas.

En el presente trabajo se propone comparar las estructuras de los ensamblajes bacterianos en muestras de suelo obtenidas a diferentes niveles de proximidad al sistema radicular de *E. coccineum*: (i) suelo no-rizosférico, (ii) suelo cercano a las raíces y (iii) suelo íntimamente asociado a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (juveniles, maduras, semi-senescentes, senescentes y raíces no-proteoideas). Postulamos que, si bien el suelo no-rizosférico albergaría una microbiota diferente a la de los suelos rizosféricos, las raíces proteoideas maduras tendrían un fuerte efecto de selección sobre la microbiota, el cual estaría asociado a una reducción del pH por la liberación de ácidos orgánicos.

Aunque los organismos que viven en un ambiente afectan el funcionamiento de éste, no está claro cuánto de este control está determinado por las identidades de las especies presentes, por el número de especies presentes, o por el número o tipo de roles funcionales que estas especies representan (Givnish 1994, Tilman y col. 1997). Por lo tanto, no basta con conocer la identidad o estructuración de los miembros de una comunidad, sino que es necesario conocer además la diversidad funcional (potencial metabólico) para comprender el papel de las comunidades microbianas en diferentes entornos (Preston-Mafhan y col. 2002). Consecuentemente, en este trabajo proponemos no sólo evaluar la estructura de los ensamblajes bacterianos a nivel genético sino

sino que también su potencial metabólico, aspecto que si bien se ha estudiado en otros suelos influenciados por plantas (e.g. Hernesmaa y col. 2005; Orlando y col. 2007; De Armas-Ricard y col. 2016), de acuerdo a nuestro conocimiento no se ha abordado en ningún sistema radicular que incluya raíces proteoideas.

Hipótesis

Debido a que el sistema radicular de *Embothrium coccineum* produce cambios a nivel edáfico, la microbiota del suelo no-rizosférico será diferente a la del suelo rizosférico. En particular, las raíces proteoideas juveniles aumentarán principalmente la diversidad genética de los ensamblajes bacterianos rizosféricos, mientras que las raíces proteoideas maduras producirán principalmente una disminución de la diversidad funcional.

Objetivo general

Evaluar los parámetros edáficos y la diversidad genética y metabólica de los ensamblajes bacterianos del suelo rizosférico de *Embothrium coccineum*, diferenciando el suelo cercano a las raíces y el íntimamente asociado a diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas, y compararla con la diversidad del suelo no-rizosférico.

Objetivos específicos

- 1) Analizar las características fisicoquímicas del suelo rizosférico de *E. coccineum* y del suelo no-rizosférico.
- 2) Caracterizar la estructura genética de los ensamblajes bacterianos del suelo rizosférico de *E. coccineum* y del suelo no-rizosférico.
- 3) Caracterizar la estructura metabólica de los ensamblajes bacterianos del suelo rizosférico de *E. coccineum* y del suelo no-rizosférico.

En cada parcela, se recolectaron muestras de suelo a diferentes niveles de proximidad del sistema radicular de *E. coccineum*: (i) suelo sin influencia de raíces, (ii) suelo cercano a raíces y (iii) suelo adherido a raíces.

El suelo sin influencia de raíces (BS, por las siglas en inglés de *Bulk Soil*) y el suelo cercano a raíces (RS, por las siglas en inglés de *Root Soil*) se recolectaron a una profundidad de hasta 30 cm. Por otra parte, el suelo adherido a raíces se recolectó mediante la remoción de éste con un cepillo y una espátula. Este suelo se clasificó de acuerdo al estadio de desarrollo de las raíces proteoideas en: raíces proteoideas juveniles (JCR, por las siglas en inglés de *Juvenile Cluster Roots*), raíces proteoideas maduras (MCR, por las siglas en inglés de *Mature Cluster Roots*), raíces proteoideas semi-senescentes (sSCR, por las siglas en inglés de *semi-Senescent Cluster Roots*), raíces proteoideas senescentes (SCR, por las siglas en inglés de *Senescent Cluster Roots*) y raíces no proteoideas (NCR, por las siglas en inglés de *Non-Cluster Roots*) (Figura 2). En 3 de las 9 parcelas no se detectó la presencia de JCR, por lo que se recolectaron en total 60 muestras de suelo. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

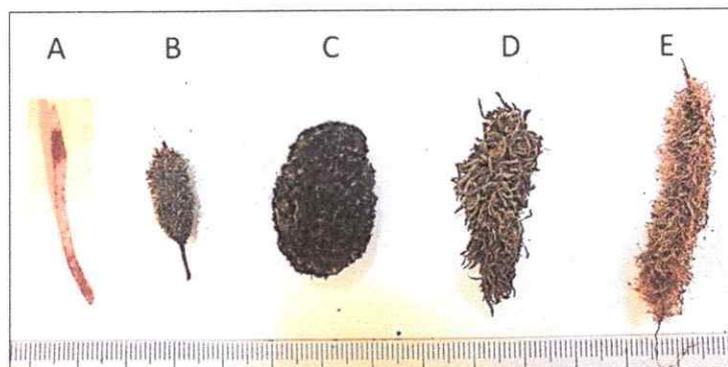


Figura 2. Secciones radiculares representando los diferentes estadios de maduración de las raíces proteoideas. A. Raíces no proteoideas (NCR). B. Raíces proteoideas juveniles (JCR). C. Raíces proteoideas maduras (MCR). D. Raíces proteoideas semi-senescentes (sSCR). E. Raíces proteoideas senescentes (SCR). Las líneas largas de la escala están separadas 1 cm.

2.2. Parámetros edáficos

A partir de las muestras del suelo sin influencia de raíces (BS) y el suelo cercano a raíces (RS), se determinaron los siguientes parámetros edáficos: contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); pH de extracto de suelo en agua (pH-H₂O); nitrógeno del amonio (N-NH₄⁺); nitrógeno del nitrato (N-NO₃⁻); fósforo Olsen (P-Olsen); capacidad de intercambio de cationes efectiva (CICE); cationes: calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na), aluminio (Al).

El CH se determinó por gravimetría. Para ello se determinó el peso húmedo (PH) de aproximadamente 1 g de suelo; posteriormente se secó en una estufa a 100°C durante 24 h y se determinó el peso seco (PS); finalmente el contenido hídrico se calculó según la fórmula: $CH = ((PH-PS)/PS) \times 100$ (Steubing y col 2002).

La MO se determinó a partir del suelo seco obtenido anteriormente, el cual se calcinó en una mufla a 400°C durante 16 h, obteniéndose el peso calcinado (PC). El porcentaje de materia orgánica se calculó según la fórmula: $MO = ((PS - PC)/PC) \times 100 \times 0,8$ (Sadzawka y col. 2006).

Para la determinación de pH, N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻ (Yang 1998) se resuspendió 1 g de suelo en 10 ml de agua desionizada, se agitó por 1 h a 150 rpm, y se filtró utilizando papel secante. El pH-H₂O de la suspensión de suelo se midió mediante un pHmetro previamente calibrado. El N-NH₄⁺ se determinó utilizando un electrodo ion selectivo y se asociaron los valores a una curva de calibración previamente analizada con el mismo electrodo. El N-NO₃⁻ se determinó mezclando 1 ml de la suspensión inicial con 0,5 ml de solución TRI (1% salicilato de sodio, 0,2% NaCl y 0,1% sulfamato de amonio en solución de 0,01 M NaOH). Posteriormente la solución se evaporó en estufa a 100°C durante 2 h y se dejó enfriar. Los residuos se resuspendieron con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, luego de 5 min se agregaron 5 ml de agua desionizada y se dejó secar hasta que la solución se enfrió. Finalmente, se adicionaron 5 ml de 40% NaOH y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 410 nm. Como blanco experimental se utilizó agua desionizada.

El P-Olsen se midió desde un extracto de 1 g de suelo con 30 ml de NaHCO₃ 0,5 M a pH 8,5 agitado durante 30 min a 180 rpm (Olsen & Sommers 1982). La mezcla se filtró y 5 ml del eluido se mezclaron con un reactivo conteniendo ácido sulfúrico 0,5 M, molibdato de amonio tetrahidratado 4 mM, tartrato de antimonio y potasio 0,5 mM y ácido ascórbico 30 mM en agua

desionizada. El color azul del complejo se determinó espectrofotométricamente a 880 nm de acuerdo al método azul de molibdeno descrito por Drummond & Maher (1995).

Finalmente, los cationes Ca, Mg, K y Na se extrajeron con acetato de amonio 1 M a pH 7,0 y el catión Al con cloruro de potasio 1 M, los cuales se midieron por espectrofotometría de absorción y emisión atómica con lantano. La CICE se calculó sumando la concentración de los cationes determinados anteriormente (Sadzawka y col. 2006).

Las mediciones de P-Olsen, CICE y cationes se determinaron mediante el servicio del Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

Las diferencias estadísticas de las variables edáficas en ambos tipos de suelo se determinaron utilizando la prueba t de Student en el programa GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc).

2.3. Estructura genética de los ensamblajes bacterianos

La estructura genética de los ensamblajes bacterianos se determinó a partir del polimorfismo en el largo de los fragmentos terminales de restricción (TRFLP, por las siglas en inglés de *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*). El método se basa en la amplificación por PCR de una mezcla de variantes de un determinado marcador molecular utilizando al menos uno de los partidores marcados con fluoróforo, la digestión con una o más enzimas de

restricción y la posterior detección del tamaño de cada uno de los fragmentos terminales resultantes usando un secuenciador.

2.3.1. Extracción de DNA y amplificación por PCR

A partir de los tres tipos de muestras de suelo se extrajo el DNA usando el kit "PowerSoil DNA Isolation" (MoBio Laboratories, Inc). El DNA se eluyó en 50 μ L de buffer TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) y se almacenó a -20°C hasta su análisis. La integridad y calidad del DNA se determinaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA [pH 8.0]) teñidos con GelRed™ (Biotium, Inc.).

A partir del DNA genómico extraído, se amplificó como marcador molecular el gen del rRNA 16S por PCR utilizando los partidores *fD1-rP2* (Weisburg y col. 1991), marcando el primero de ellos en su extremo 5' con el fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluoresceína). El programa de amplificación consistió en 3 min a 94°C , 30 ciclos de 1 min a 94°C , 30 s a 57°C y 2 min a 72°C , y finalmente 7 min a 72°C . Las amplificaciones se realizaron utilizando "GoTaq® Green Master Mix" (GoTaq® DNA polimerasa en buffer de reacción Green GoTaq® [pH 8,5], 200 μ M de cada dNTP y MgCl_2 1,5 mM) (Promega), 400 nM de cada partidor y 10-20 ng de DNA genómico como molde, y se llevaron a cabo en un termociclador Maxygene II (Axygen). El tamaño y calidad de los productos amplificados se corroboró mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X teñido con GelRed™ (Biotium, Inc.) y usando el estándar de tamaño molecular 100 bp (Fermentas). Posteriormente los productos de PCR se purificaron usando el

Wizard SV PCR Clean-Up System (Promega) y su concentración se cuantificó a 260 nm utilizando el equipo "Epoch Microplate Spectrophotometer" (BioTek).

2.3.2. Obtención de los fragmentos terminales de restricción (TRFs)

Entre 80 y 100 ng de los productos de PCR se hidrolizaron con 30 U de dos enzimas de restricción *BsuRI* y *HhaI* (Fermentas) a 37°C por 16 h en reacciones independientes. Tras ello se inactivaron las enzimas incubando a 65°C por 20 min. Posteriormente se llevó a cabo una precipitación alcohólica del DNA agregando 0,1 volúmenes de acetato de sodio (3 M) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó a -20°C por 12 h. Luego, se centrifugó a 4°C durante 30 min a 13000 rpm y el pellet se lavó con etanol 70% centrifugando a 4°C por 10 min a 13000 rpm. Finalmente, se secó el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA en 20 µl de solución TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA [pH 8,0]). Los fragmentos digeridos se separaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). El tamaño de los fragmentos y las unidades de fluorescencia se determinaron usando el programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.).

2.3.3. Análisis de los perfiles de TRFLP

Para cada muestra se generó un electroferograma a partir del cual se analizaron el número (riqueza) y la altura de los picos (abundancia). Los patrones de las diferentes muestras se normalizaron a unidades de fluorescencia total idénticas, mediante un procedimiento de normalización

iterativo (Dunbar y col. 2001) y se calculó la abundancia relativa de los TRF en cada muestra. Para ello se sumaron las alturas de todos los picos en cada perfil y el valor de unidades de fluorescencia obtenido representó la abundancia total en las diferentes muestras; con este valor se determinó la abundancia relativa (%) de cada TRF respecto al total. Aquellos picos con abundancia relativa menor a 2% se consideraron por debajo de la línea basal y no se tuvieron en cuenta en el análisis.

La estimación de la diversidad genética de los ensamblajes bacterianos se realizó mediante el índice de diversidad de Shannon, según la fórmula $H' = -\sum p_i \ln p_i$ (Shannon & Weaver 1963), donde p_i es la proporción de cada fragmento terminal dentro del total de TRFs de cada perfil. Así también, se determinó el índice de equidad usando la fórmula $J = H'/H'_{\text{máx}}$, donde $H'_{\text{máx}} = \ln S$ (Begon y col. 1990), considerando a S como el número de TRFs dentro de cada muestra, i.e. la riqueza. La significancia estadística de las diferencias entre los índices de diversidad se determinó mediante ANOVA de una vía con post-test de Tukey ($p \leq 0,05$).

El grado de relación de los ensamblajes bacterianos analizados mediante TRFLP se determinó mediante un análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico utilizando la distancia euclídeana. Asimismo, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) para determinar el coeficiente R , que cuanto más grande y positivo (hasta 1) indica mayor disimilitud entre los grupos comparados. Finalmente, se calcularon los porcentajes de disimilitud entre los

grupos (SIMPER). Todos estos análisis se llevaron a cabo en la herramienta PAST v2.17c (Hammer y col. 2001).

2.4. Estructura metabólica de los ensamblajes bacterianos

La estructura metabólica de los ensamblajes bacterianos se determinó a partir de los perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP, por las siglas en inglés de *Community Level Physiological Profiles*) mediante placas EcoPlate™ (BIOLOG®) que contienen 31 fuentes de carbono, más un blanco sin fuente de carbono, en triplicado (Figura 3). Dado que el consumo de las fuentes de carbono en la placa resulta en el uso de enzimas de la respiración, al consumir las bacterias dichas fuentes de carbono, reducen las sales de Tetrazolium (inoloro) al colorante Formazán (púrpura) y permiten detectar la utilización de cada una de ellas (Garland & Mills 1991).

2.4.1. Medición de la utilización de diferentes fuentes de carbono

Los inóculos para las placas se prepararon a partir de 1 g de cada muestra de suelo resuspendida en solución estéril de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄). La mezcla se agitó durante 1 h a 150 rpm, posteriormente se filtró la suspensión y se inocularon 100 µL de los filtrados en cada pocillo. Las placas inoculadas se incubaron en una cámara húmeda a 25°C por una semana y cada 24 h se registró el desarrollo de color en los pocillos individuales midiendo la absorbancia a 590 nm con un lector de placas automatizado Epoch (Biotek).

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figura 3. Distribución de las 31 fuentes de carbono dispuestas en triplicado en las placas Ecoplate™ (BIOLOG®).

2.4.2. Análisis de los perfiles de CLPP

Para cada muestra se obtuvo una matriz a partir de la cual se analizaron el número de fuentes de carbono utilizadas (riqueza) y la intensidad de dicha utilización (abundancia). Para el análisis de los datos, se restaron a las lecturas de absorbancia obtenidas en los diferentes tiempos de incubación de la placa, la lectura al tiempo cero correspondiente (Insam & Goberna 2004) y la del pocillo blanco (sin fuente de carbono). El desarrollo promedio de color en el tiempo, como respuesta microbiana en las placas (Garland 1997), se ajustó a la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering y col. 1990) con el programa

OriginPro8, y posteriormente se calcularon los parámetros cinéticos de los perfiles metabólicos (λ : tiempo de latencia, μ m: tasa máxima de desarrollo de color, y A: absorbancia máxima). Mediante estos cálculos se determinó el tiempo de incubación de las placas en que los ensambles se encuentran en fase exponencial, datos que se utilizaron para llevar a cabo el análisis comparativo de los perfiles metabólicos a nivel comunitario de las diferentes muestras.

A partir de cada perfil de consumo, y de manera similar a lo realizado con los perfiles de TRFLP, se calcularon los índices de diversidad (H' , J , S) para cada muestra y se compararon los ensambles mediante análisis multivariados NMDS y análisis de similitud ANOSIM y SIMPER en el programa PAST v2.17c.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de parámetros edáficos

Los parámetros edáficos se midieron en el suelo sin influencia de raíces (BS) y el suelo cercano a raíces (RS) de *E. coccineum*. Se observó que en este último casi todos los parámetros medidos fueron más altos, aunque no significativamente, que en el suelo sin influencia de raíces, detectándose diferencias significativas en el N-NO₃⁻, el K y el Al. Sin embargo, el pH fue significativamente más ácido (Figura 4).

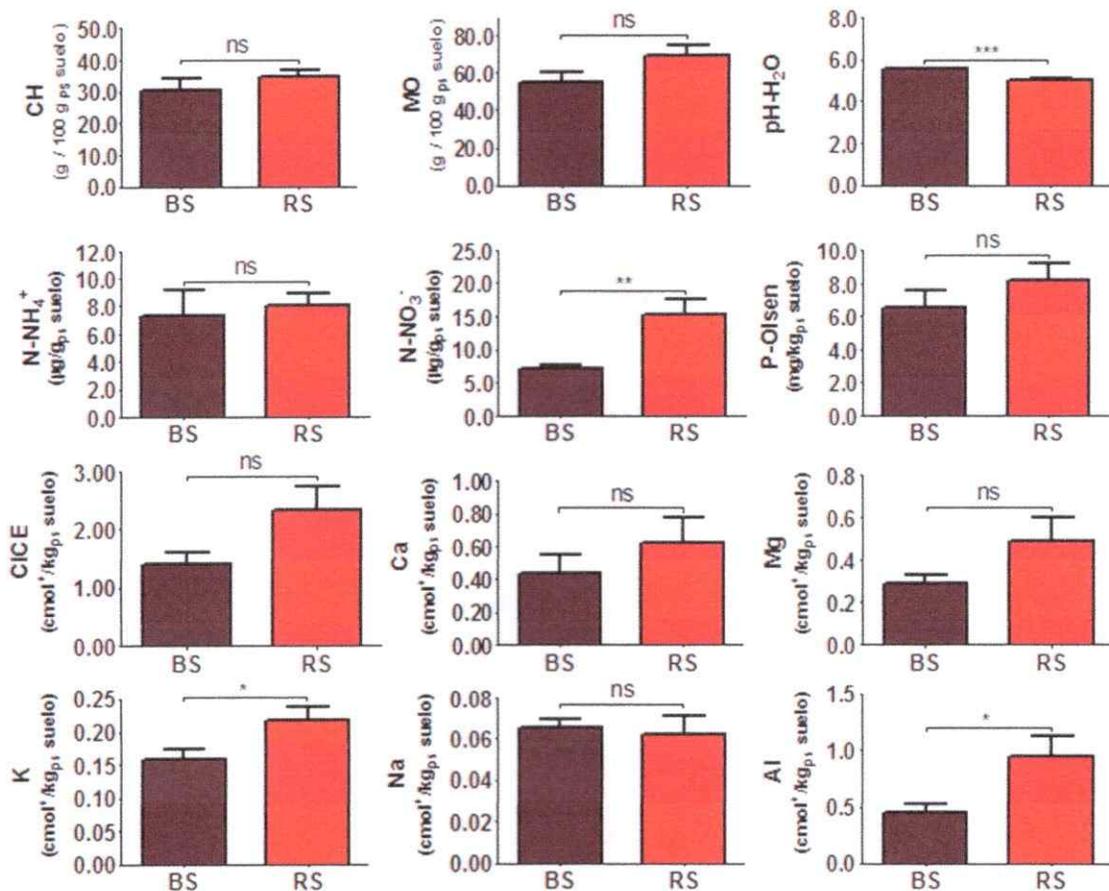


Figura 4. (leyenda en página siguiente).

Figura 4. (figura en página anterior) Parámetros edáficos medidos en las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS). CH: contenido hídrico. MO: materia orgánica. pH-H₂O: pH de extracto de suelo en agua. N-NH₄⁺: nitrógeno del amonio. N-NO₃⁻: nitrógeno del nitrato. P-Olsen: fósforo Olsen. CICE: capacidad de intercambio de cationes efectiva. Cationes: calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na), aluminio (Al). Los valores representan el promedio (n=9) y las barras de error la desviación estándar. Diferencias de acuerdo a la prueba t de Student (ns: no significativas; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

3.2. Caracterización de la estructura genética de los ensamblajes bacterianos

La diversidad genética se determinó mediante TRFLP del gen que codifica para el rRNA 16S amplificado con partidores para bacterias en general y utilizando independientemente 2 enzimas de restricción distintas.

Los patrones de TRFLP obtenidos con cada enzima de restricción se muestran según la abundancia relativa de cada TRF en la Figura 5. En total se obtuvieron 59 TRFs con las dos enzimas utilizadas (34 con *HhaI* y 25 con *BsuRI*). Los TRFs más abundantes en la mayoría de las muestras de suelos, independientemente de la influencia o no de raíces, fueron 38H, 43H, 55H, 37B, 43B y 146B. El suelo sin influencia de raíces (BS) y el suelo cercano a raíces (RS) compartieron varios TRFs representando sobre el 10% de la fluorescencia total, pero los TRFs 290H y 88B fueron muchos más abundantes en el primero y el TRF 15B en el segundo. El suelo adherido a las raíces proteoideas juveniles (JCR) mostró mayor cantidad de TRFs representando más del 10% de la fluorescencia total (89H, 208H, 557H, 446B), diferenciándose de los otros estadios de desarrollo de las raíces proteoideas que mostraron perfiles más

similares entre sí. Llama la atención el TRF 484B, el cual está presente en el suelo adherido a todos los estadios de desarrollo de las raíces proteoideas representando sobre un 20% de la fluorescencia total pero disminuyendo a cerca de un 7% en el suelo adherido a las raíces proteoideas senescentes (Figura 5).

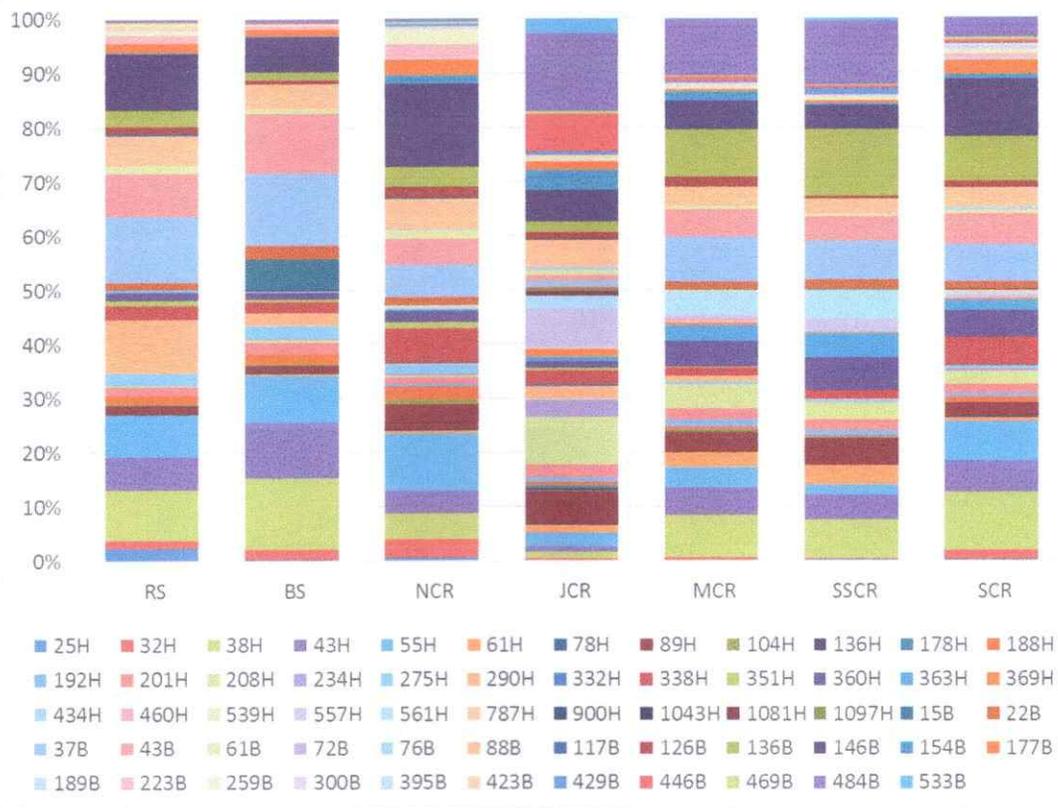


Figura 5. Frecuencia relativa de los fragmentos de restricción del gen del rRNA 16S de los ensamblajes bacterianos de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoideas, JCR: raíces proteoideas juveniles, MCR: raíces proteoideas maduras, sSCR: raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: raíces proteoideas senescentes). En la leyenda se indican los diferentes TRFs designados por el largo en pares de bases y una letra indicando la enzima de restricción con la que se obtuvieron.

En la Figura 6 se muestra el resultado del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS). Se puede observar que hay una tendencia a la separación a lo largo de la coordenada 2, siendo los parámetros edáficos que mayormente la explican el nitrógeno del nitrato (N-NO₃) y el pH de extracto de suelo en agua (pH-H₂O) (Tabla 1). Al comparar los perfiles genéticos de ambos tipos de muestras mediante un análisis de SIMPER, se obtuvo una disimilitud de 38,5%; sin embargo el análisis de ANOSIM indicó que estos grupos no presentan una diferencia significativa ($R=0,0729$; $p=0,1861$).

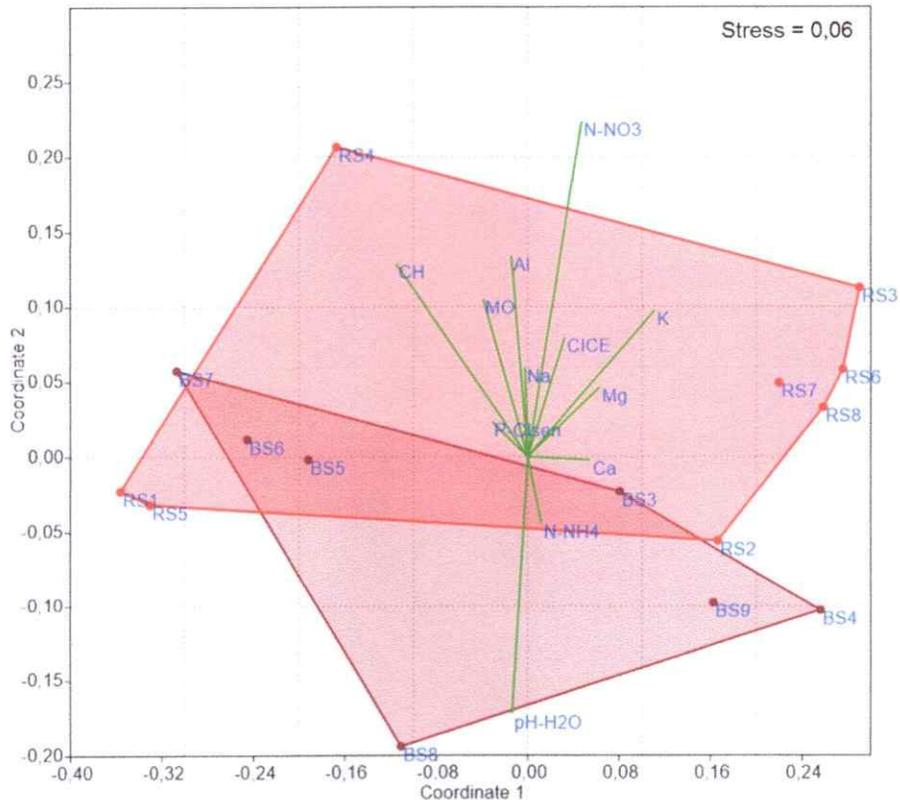


Figura 6. (Leyenda en página siguiente)

Figura 6. (Figura en página anterior) Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles genéticos (TRFLP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS). CH: contenido hídrico. MO: materia orgánica. pH-H₂O: pH de extracto de suelo en agua. N-NH₄: nitrógeno del amonio. N-NO₃: nitrógeno del nitrato. P-Olsen: fósforo Olsen. CICE: capacidad de intercambio de cationes efectiva. Cationes: calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na), aluminio (Al).

Tabla 1. Valores de carga de las variables explicativas para las dos primeras coordenadas del análisis de escalamiento multidimensional no métrico basado en la estructura genética (TRFLP).

	Coordenada 1	Coordenada 2
CH	-0,4112	0,4601
MO	-0,1388	0,3768
pH-H ₂ O	-0,0477	-0,6137
N-NH ₄	0,0417	-0,1579
N-NO ₃	0,1683	0,7974
P-Olsen	-0,1119	0,0832
CICE	0,1154	0,2859
Ca	0,1973	-0,0061
Mg	0,2248	0,1665
K	0,3966	0,3491
Na	-0,0087	0,2139
Al	-0,0511	0,4788

CH: contenido hídrico. MO: materia orgánica. pH-H₂O: pH de extracto de suelo en agua. N-NH₄: nitrógeno del amonio. N-NO₃: nitrógeno del nitrato. P-Olsen: fósforo Olsen. CICE: capacidad de intercambio de cationes efectiva. Cationes: calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na), aluminio (Al). En negrita se destacan los valores de carga más altos.

En la Figura 7 se muestra el resultado del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en los perfiles genéticos y utilizando la distancia euclídeana, de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas. A simple vista, las muestras que más se diferencian del resto corresponden al suelo adherido a raíces

proteoides juveniles (JCR), mientras que las muestras de suelo adherido a raíces no proteoides (NCR) se diferencian de las de suelo adherido a raíces proteoides semi-senescentes (sSCR).

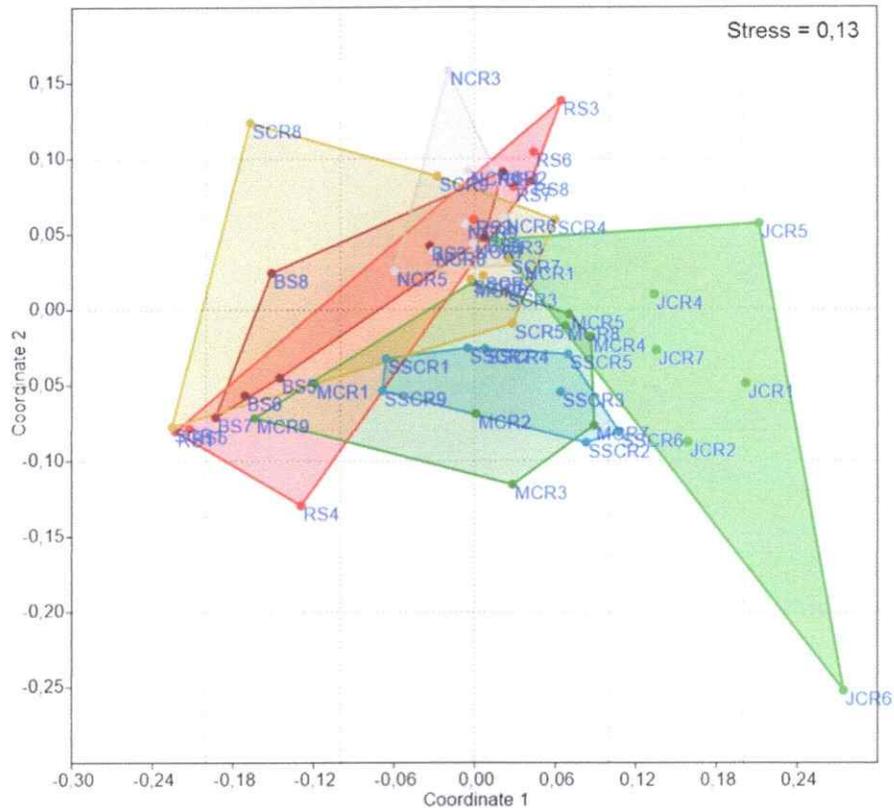


Figura 7. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles genéticos (TRFLP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoides de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoides, JCR: raíces proteoides juveniles, MCR: raíces proteoides maduras, sSCR: raíces proteoides semi-senescentes, SCR: raíces proteoides senescentes).

Estas observaciones se confirman al evaluar los resultados de los análisis de similitud ya que, aunque muchas de los perfiles comparados son significativamente diferentes, los valores más altos del coeficiente de determinación (R) calculado mediante ANOSIM corresponden a las

comparaciones de los ensamblajes asociados al suelo de las raíces proteoideas juveniles con el resto (Tabla 2). Asimismo, aunque casi todas las comparaciones entre los perfiles arrojan porcentajes de disimilitud altos, los mayores porcentajes se observaron en su mayoría al comparar las muestras de suelo adherido a raíces proteoideas juveniles (JCR) con el resto de las muestras (Tabla 3).

Tabla 2. Coeficientes de determinación y la significancia de las comparaciones de acuerdo a ANOSIM, de los perfiles genéticos (TRFLP).

	BS	RS	NCR	JCR	MCR	sSCR	SCR
BS		0,0162	0,2361	0,4657	0,2157	0,3923	0,1233
RS	0,3075		0,2352	0,4038	0,2188	0,4308	0,1276
NCR	0,0155	0,0055		0,5795	0,4091	0,7066	0,1365
JCR	0,0010	0,0003	0,0005		0,2448	0,4308	0,3534
MCR	0,0365	0,0316	0,0004	0,0111		-0,0729	0,0569
sSCR	0,0026	0,0003	0,0002	0,0005	0,8396		0,2365
SCR	0,0908	0,0804	0,0055	0,0006	0,1662	0,0028	

BS: suelo sin influencia de raíces, RS: suelo cercano a raíces, NCR: suelo adherido a raíces no proteoideas, JCR: suelo adherido a raíces proteoideas juveniles, MCR: suelo adherido a raíces proteoideas maduras, sSCR: suelo adherido a raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: suelo adherido a raíces proteoideas senescentes.

Coefficientes de determinación arriba en tonos de rojo; significancia de las comparaciones abajo en tonos de verde.

Tabla 3. Porcentajes de disimilitud de acuerdo a SIMPER de los perfiles genéticos (TRFLP).

	BS	RS	NCR	JCR	MCR	sSCR	SCR
BS		52,0	52,3	78,3	60,7	64,0	54,7
RS			52,7	77,3	64,8	68,3	57,0
NCR				71,5	60,4	62,7	48,2
JCR					63,1	61,7	69,8
MCR						45,9	53,6
sSCR							52,3
SCR							

BS: suelo sin influencia de raíces, RS: suelo cercano a raíces, NCR: suelo adherido a raíces no proteoideas, JCR: suelo adherido a raíces proteoideas juveniles, MCR: suelo adherido a raíces proteoideas maduras, sSCR: suelo adherido a raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: suelo adherido a raíces proteoideas senescentes.

Al estimar la diversidad (H'), riqueza (S) y equidad (J) de los ensamblajes bacterianos en los diferentes tipos de muestras de suelo (Figura 8), no se observaron diferencias significativas.

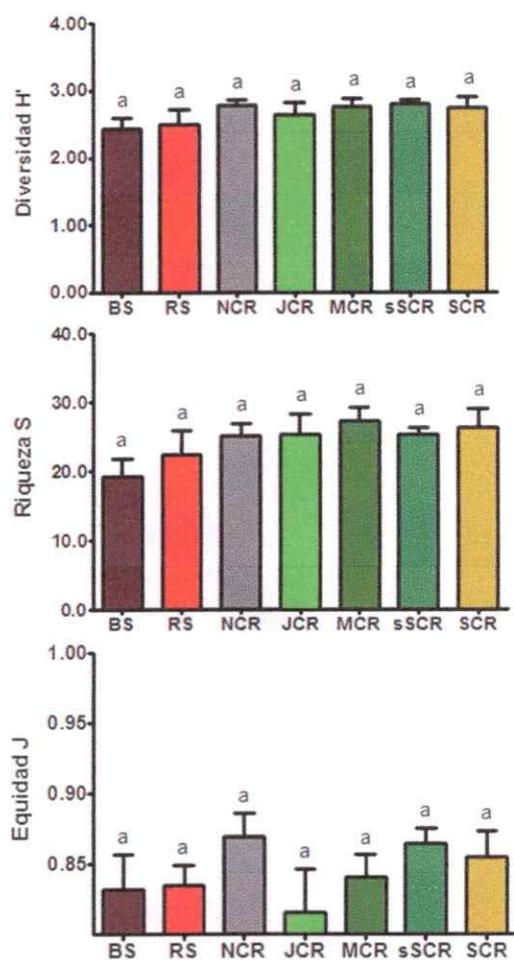


Figura 8. Índices de diversidad de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoideas, JCR: raíces proteoideas juveniles, MCR: raíces proteoideas maduras, sSCR: raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: raíces proteoideas senescentes). Panel superior: diversidad de Shannon (H'), panel medio: riqueza (S), panel inferior: equidad (J). Los valores representan el promedio ($n=9$) y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a ANOVA de una vía y post-test de Tukey.

3.3. Caracterización de la estructura metabólica de los ensambles bacterianos

La diversidad metabólica potencial de los ensambles bacterianos presentes en los suelos colectados se evaluó por medio de placas EcoPlate™ (BIOLOG®) midiendo la capacidad de utilización de diversas fuentes de carbono.

Primeramente se realizaron curvas cinéticas para determinar en qué tiempo de lectura los ensambles se encontraban en fase exponencial del consumo de las fuentes de carbono, lo que permite realizar una adecuada comparación entre las diferentes muestras. En cada curva se determinaron los parámetros λ (tiempo de latencia), μ_m (tasa máxima de desarrollo de color) y A (absorbancia máxima) (Figura 9).

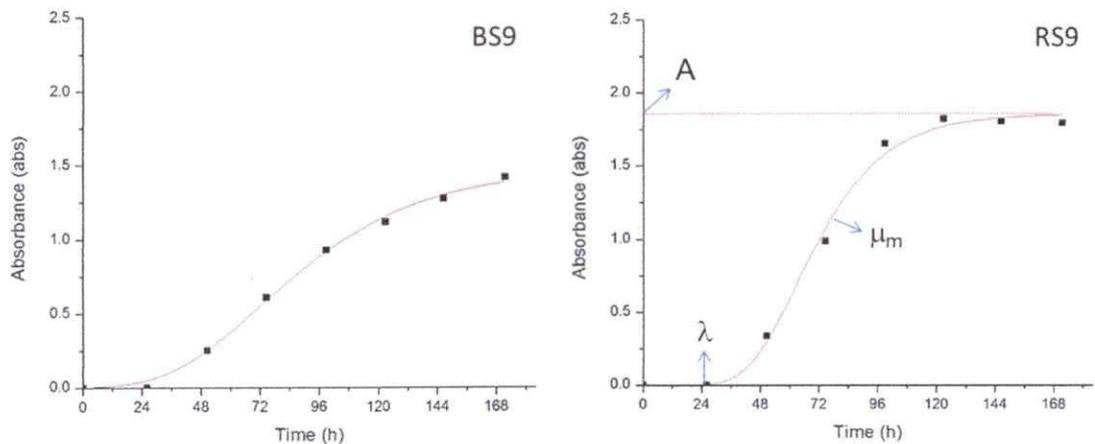


Figura 9. Curvas de la cinética del consumo promedio de fuentes de carbono en las ecoplacas. Se muestran en el panel de la derecha los parámetros cinéticos λ : tiempo de latencia, μ_m : tasa máxima de desarrollo de color, y A: absorbancia máxima. BS9: muestra 9 de suelo sin influencia de raíces. RS9: muestra 9 de suelo cercano a raíces.

Al comparar los parámetros cinéticos λ , μ_m y A entre todos los tipos de muestras (Figura 10), se observa que el tiempo de latencia (λ) fue significativamente menor en el suelo adherido a raíces proteoideas semi-senescentes (sSCR) que en el suelo adherido a raíces proteoideas senescentes (SCR), no encontrándose diferencias significativas en las comparaciones entre el resto de los suelos para este parámetro. Por otro lado, la tasa máxima de desarrollo de color (μ_m) y la absorbancia máxima (A) presentaron valores mayores en los suelos rizosféricos respecto al suelo sin influencia de raíces.

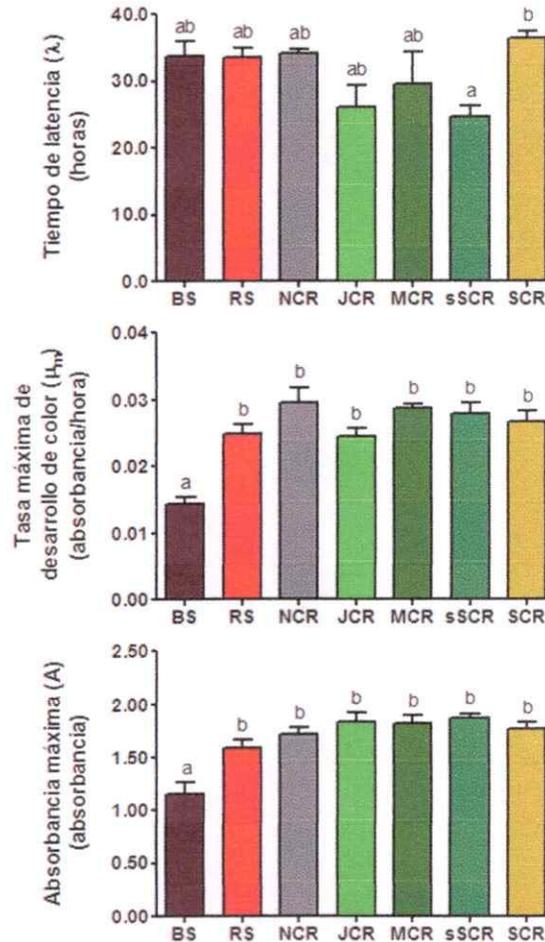


Figura 10. (leyenda en página siguiente)

Figura 10. (*figura en página anterior*) Parámetros cinéticos de las curvas de utilización de fuentes de carbono en las ecoplacas de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoideas, JCR: raíces proteoideas juveniles, MCR: raíces proteoideas maduras, sSCR: raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: raíces proteoideas senescentes). Los valores representan el promedio (n=9) y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a ANOVA de una vía y post-test de Tukey.

Posteriormente, usando el tiempo de lectura de las placas en que todos los ensambles se encuentran en la fase exponencial de consumo de las fuentes de carbono (72 h), se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la distancia euclídeana, en el cual se observa una clara separación entre las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y las de suelo cercano a raíces (RS) a lo largo de la coordenada 1 (Figura 11).

Figura 11. (*figura en página siguiente*) Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles metabólicos (CLPP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS). CH: contenido hídrico. MO: materia orgánica. pH-H₂O: pH de extracto de suelo en agua. N-NH₄: nitrógeno del amonio. N-NO₃: nitrógeno del nitrato. P-Olsen: fósforo Olsen. CICE: capacidad de intercambio de cationes efectiva. Cationes: calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na), aluminio (Al).

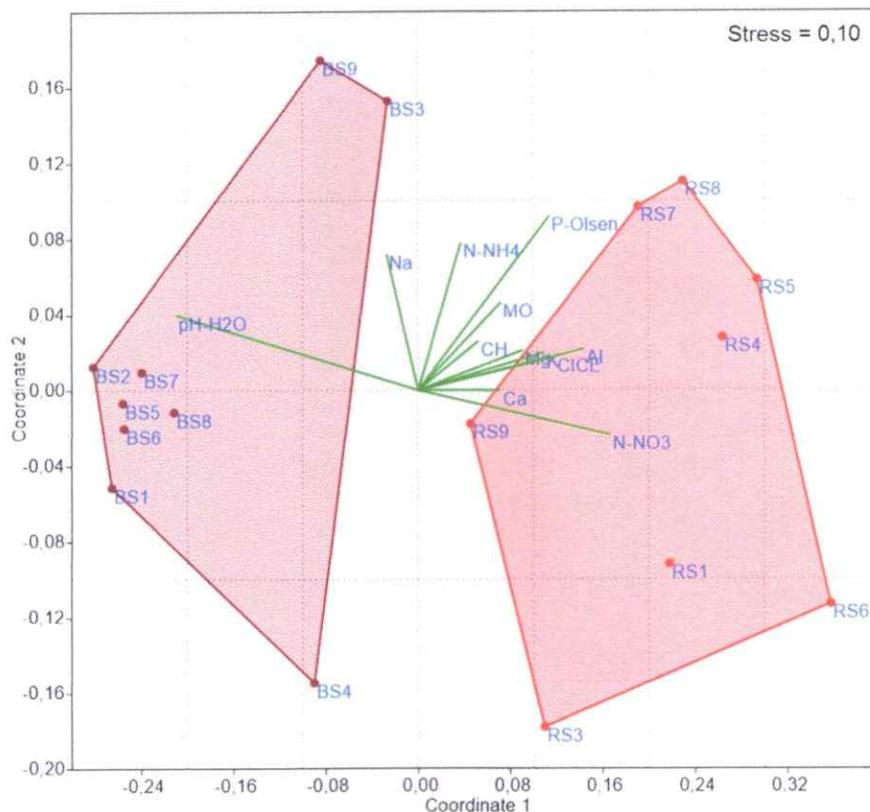


Figura 11. (leyenda en página anterior)

Los parámetros que principalmente explican esta separación son nuevamente el pH de extracto de suelo en agua (pH-H₂O) y el nitrógeno del nitrato (N-NO₃) (Tabla 4). Al comparar los perfiles metabólicos de ambos tipos de muestras mediante un análisis de SIMPER se obtuvo una disimilitud de 23,2% y el análisis de ANOSIM indicó que estos grupos presentan una diferencia significativa ($R=0,5017$, $p=0,0014$).

Tabla 4. Valores de carga de las variables explicativas para las dos primeras coordenadas del análisis de escalamiento multidimensional no métrico basado en la estructura metabólica (CLPP).

	Coordenada 1	Coordenada 2
CH	0,2125	0,1050
MO	0,2909	0,1877
pH-H2O	-0,8486	0,1620
N-NH4	0,1511	0,3153
N-NO3	0,6779	-0,0943
P-Olsen	0,4611	0,3720
CICE	0,4800	0,0709
Ca	0,2902	-0,0004
Mg	0,3677	0,0856
K	0,4436	0,0809
Na	-0,1105	0,2911
Al	0,5838	0,0891

CH: contenido hídrico. MO: materia orgánica. pH-H2O: pH de extracto de suelo en agua. N-NH4: nitrógeno del amonio. N-NO3: nitrógeno del nitrato. P-Olsen: fósforo Olsen. CICE: capacidad de intercambio de cationes efectiva. Cationes: calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na), aluminio (Al). En negrita se destacan los valores de carga más altos.

En la Figura 12 se muestra el resultado del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado en los perfiles metabólicos y utilizando la distancia euclídeana, de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas. A simple vista, las muestras que más se diferencian del resto corresponden al suelo sin influencia de raíces (BS), mientras que las muestras de suelo cercano a raíces (RS) tienden a diferenciarse de las de suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estados de desarrollo.

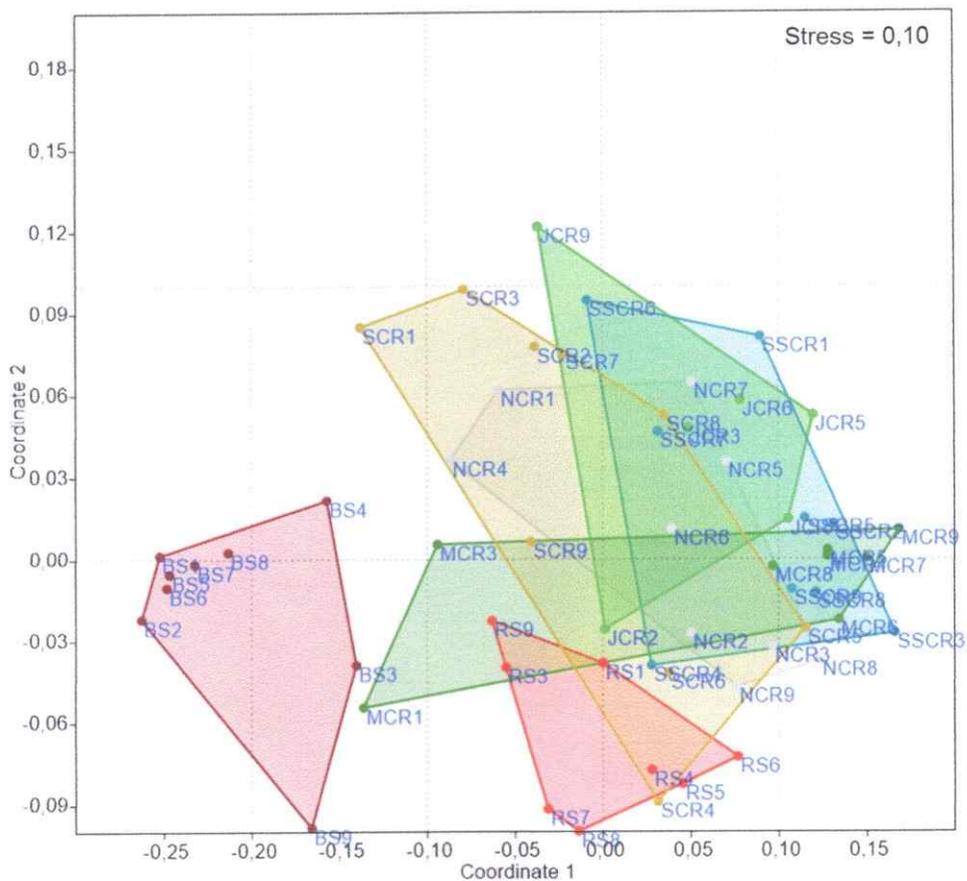


Figura 12. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMS), basado en la distancia euclídeana, de los perfiles metabólicos (CLPP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoideas, JCR: raíces proteoideas juveniles, MCR: raíces proteoideas maduras, sSCR: raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: raíces proteoideas senescentes).

Estas observaciones se confirman al evaluar los resultados de los análisis de similitud ya que, aunque muchas de los perfiles comparados son significativamente diferentes, los valores más altos del coeficiente de determinación (R) calculado mediante ANOSIM corresponden a dichas comparaciones (i.e. BS se diferencia claramente de los suelos rizosféricos) (Tabla 5). Asimismo, aunque casi todas las comparaciones entre los perfiles

revelan porcentajes de disimilitud bajos, al comparar las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) con el resto de las muestras los porcentajes aumentan notoriamente, seguidos por los porcentajes de disimilitud de la mayoría de las comparaciones entre el suelo cercano a raíces (RS) y el suelo adherido a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas. Entre estos últimos las raíces maduras y senescentes son las que presentan la mayor disimilitud (Tabla 6).

Tabla 5. Coeficientes de determinación y la significancia de las comparaciones de acuerdo a ANOSIM, de los perfiles metabólicos (CLPP).

	BS	RS	NCR	JCR	MCR	sSCR	SCR
BS		0,8885	0,9204	0,9782	0,7513	0,9890	0,8680
RS	0,0004		0,2526	0,6550	0,4174	0,6007	0,2826
NCR	0,0003	0,0121		0,1111	0,1319	0,0226	0,0247
JCR	0,0004	0,0004	0,0785		0,1395	-0,0472	0,0988
MCR	0,0001	0,0023	0,0360	0,1592		0,0213	0,2435
sSCR	0,0001	0,0001	0,0282	0,1838	0,1232		0,2551
SCR	0,0002	0,0003	0,5251	0,1375	0,0179	0,0074	

BS: suelo sin influencia de raíces, RS: suelo cercano a raíces, NCR: suelo adherido a raíces no proteoideas, JCR: suelo adherido a raíces proteoideas juveniles, MCR: suelo adherido a raíces proteoideas maduras, sSCR: suelo adherido a raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: suelo adherido a raíces proteoideas senescentes.

Coefficientes de determinación arriba en tonos de rojo; significancia de las comparaciones abajo en tonos de verde.

Tabla 6. Porcentajes de disimilitud de acuerdo a SIMPER de los perfiles metabólicos (CLPP).

	BS	RS	NCR	JCR	MCR	sSCR	SCR
BS		42,5	46,7	48,7	49,7	50,5	45,2
RS			20,1	24,8	24,6	23,3	23,7
NCR				20,3	21,3	18,4	20,7
JCR					21,6	18,2	23,0
MCR						19,7	25,2
sSCR							21,7
SCR							

BS: suelo sin influencia de raíces, RS: suelo cercano a raíces, NCR: suelo adherido a raíces no proteoideas, JCR: suelo adherido a raíces proteoideas juveniles, MCR: suelo adherido a raíces proteoideas maduras, sSCR: suelo adherido a raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: suelo adherido a raíces proteoideas senescentes.

Al estimar la diversidad (H'), riqueza (S) y equidad (J) de los ensamblajes bacterianos, a nivel metabólico, en los diferentes tipos de muestras de suelo (Figura 13), se observaron diferencias significativas en la diversidad y riqueza de los ensamblajes sin influencia de raíces (BS) respecto a las muestras de suelo rizosférico. Por otro lado, la equidad en la utilización de las fuentes de carbono fue significativamente mayor en el suelo adherido a raíces proteoideas maduras (MCR) en comparación a las de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo adherido a raíces proteoideas senescentes (SCR).

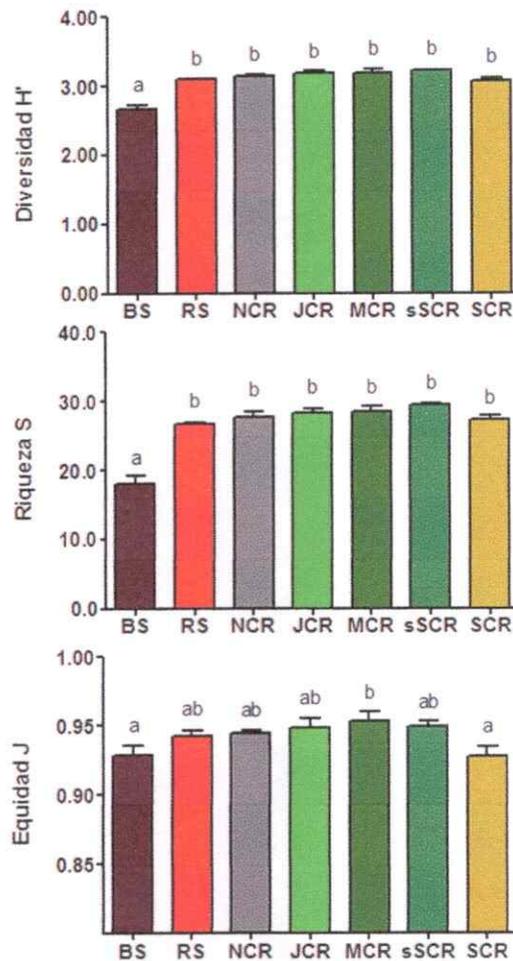


Figura 13. Índices de diversidad de los perfiles metabólicos (CLPP) de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoideas, JCR: raíces proteoideas juveniles, MCR: raíces proteoideas maduras, sSCR: raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: raíces proteoideas senescentes). Panel superior: diversidad de Shannon (H'), panel medio: riqueza (S), panel inferior: equidad (J). Los valores representan el promedio ($n=9$) y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a ANOVA de una vía y post-test de Tukey.

Al comparar la utilización individual de cada una de las fuentes de carbono ensayadas, se observa que los suelos cercanos a las raíces (RS) presentan un

mayor nivel de consumo que los suelos sin influencia de raíces (BS), siendo 9 de las fuentes consumidas al menos 5 veces más en los suelos cercanos a las raíces: β -Metil-D-Glucósido, D-Xilosa, i-Eritritol, α -Ciclodextrina, Glucógeno, Glucosa-1-Fosfato, Feniletilamina, α -D-Lactosa y Ácido D-Málico (Figura 14).

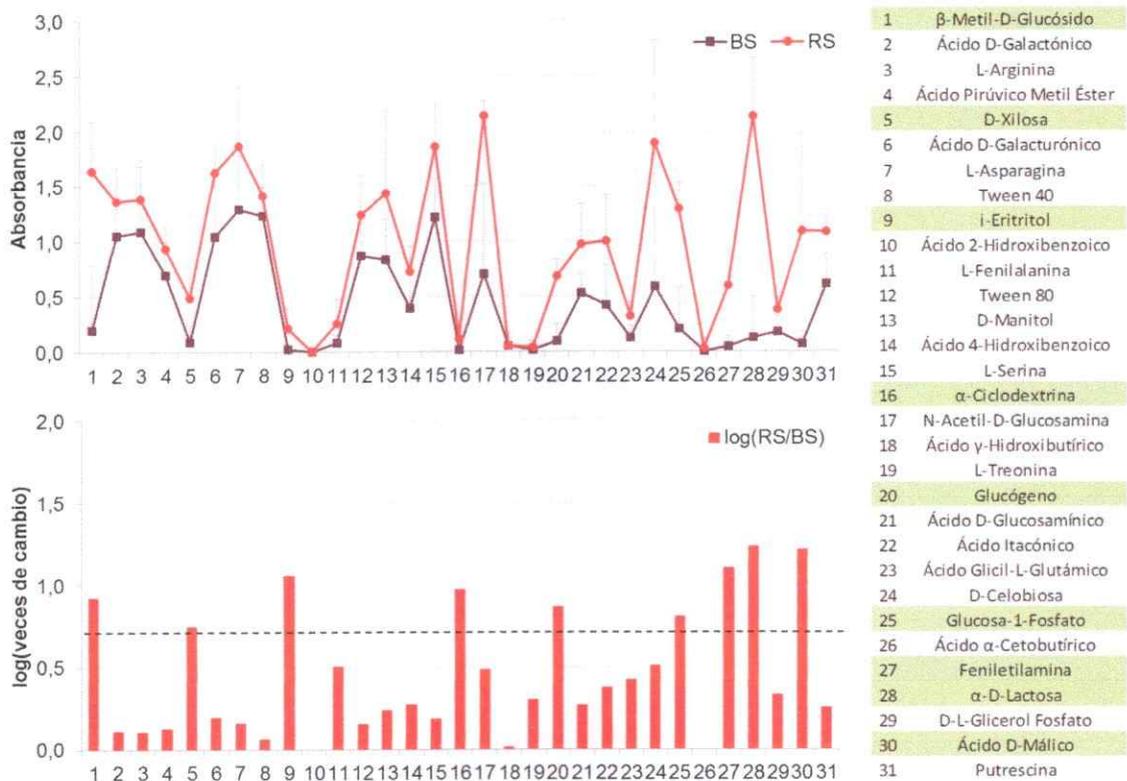


Figura 14. Utilización de cada una de las fuentes de carbono de las ecoplacas. Panel superior: absorbancia promedio de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS) y suelo cercano a raíces (RS) (n=9), barras de error indican desviación estándar. Panel inferior: logaritmo de las veces de cambio en la utilización de las fuentes de carbono en muestras RS respecto a BS. Panel derecho: fuentes de carbono presentes en las ecoplacas, se resaltan en verde aquellas fuentes que son utilizadas al menos 5 veces más en el suelo rizosférico.

Al agregar a la comparación los suelos adheridos a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas, se mantiene la misma tendencia general y son las mismas fuentes de carbono, a excepción de Glucosa-1-Fosfato, las que fueron consumidas al menos 5 veces más en los suelos rizosféricos en comparación al suelo sin influencia de raíces (Figura 15).

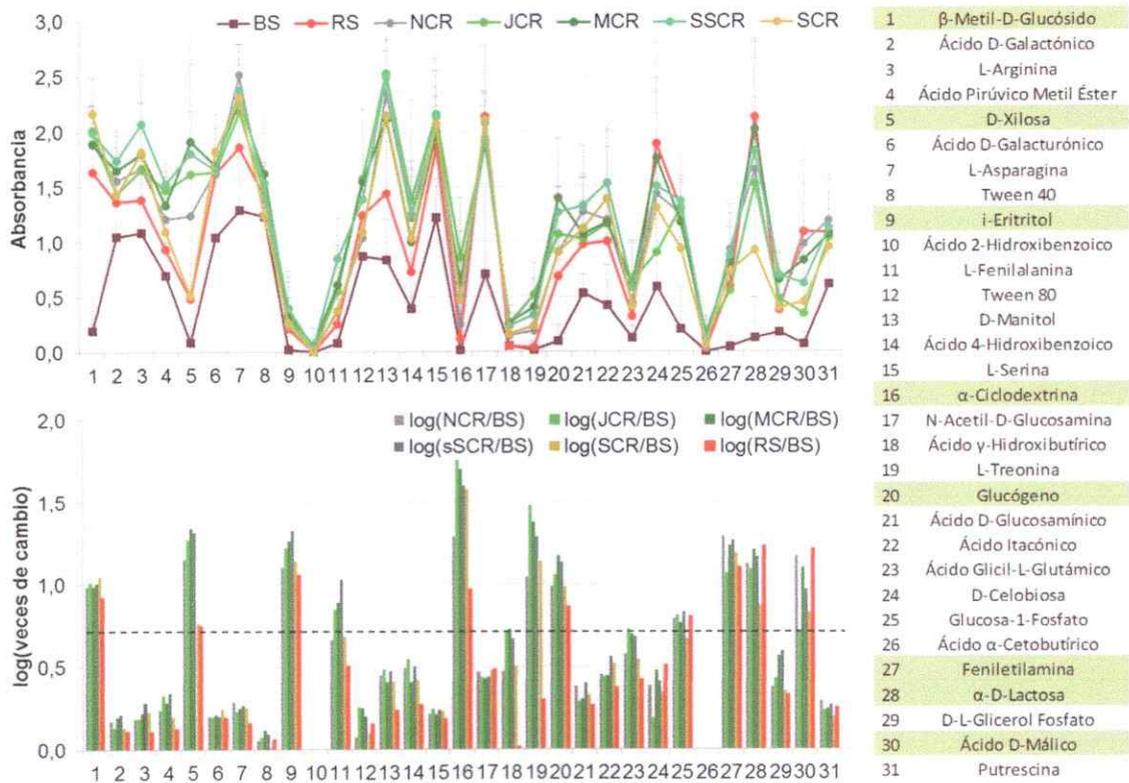


Figura 15. Utilización de cada una de las fuentes de carbono de las ecoplaques. Panel superior: absorbancia promedio de las muestras de suelo sin influencia de raíces (BS), suelo cercano a raíces (RS) y suelo adherido a raíces proteoideas de diferentes estadios de desarrollo (NCR: raíces no proteoideas, JCR: raíces proteoideas juveniles, MCR: raíces proteoideas maduras, sSCR: raíces proteoideas semi-senescentes, SCR: raíces proteoideas senescentes) (n=9), barras de error indican desviación estándar. Panel inferior: relación de la utilización de las fuentes de carbono en cada tipo de muestra respecto a BS. Panel derecho: fuentes de carbono presentes en las ecoplaques, se resaltan en verde aquellas fuentes que son utilizadas al menos 5 veces más en el suelo rizosférico.

4. DISCUSIÓN

4.1. Parámetros edáficos en suelos con y sin influencia de las raíces de *E. coccineum*

Las raíces proteoideas aumentan la incorporación de nutrientes desde el suelo no sólo por aumentar la superficie de absorción, sino también por la liberación de compuestos orgánicos que permiten la solubilización de nutrientes no biodisponibles, principalmente fósforo. En este trabajo encontramos que la disponibilidad de fósforo (cerca de 7 mg/kg_{PS} de suelo en promedio) fue similar a lo reportado por Zúñiga y col. (2010, 2015) y fue ligeramente mayor en la rizósfera de *E. coccineum* que en el suelo sin influencia de raíces, aunque no se observaron diferencias significativas (Figura 4). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Delgado y col. (2015b), quienes encontraron un contenido de fósforo inorgánico lábil ligeramente aumentado en la rizósfera de raíces proteoideas maduras de plantas adultas de *E. coccineum* creciendo en condiciones naturales, comparado con el suelo sin influencia de las raíces. Adicionalmente, encontramos un aumento del nitrógeno proveniente del nitrato cercano a las raíces de *E. coccineum* (Figura 4), lo que podría estar relacionado al incremento de exudados radiculares que proporcionan fuentes de carbono a microorganismos relacionados con el ciclo del nitrógeno (Orlando y col. 2010). Por otro lado, se ha reportado que, las raíces proteoideas de *E. coccineum* no serían inducidas sólo por la deficiencia de fósforo (Delgado y col. 2013, 2014)

sino también por la deficiencia de nitrógeno del suelo (Piper y col. 2013). La necesidad de estas plantas de formar raíces con mayor capacidad para adquirir nitrógeno podría relacionarse con el alto contenido de nitrógeno encontrado en el follaje de individuos adultos de *E. coccineum* comparado con otras plantas de bosques lluviosos (Lusk & Corcuera 2011), lo cual generaría mayor incorporación de nitrógeno en el suelo a través de la descomposición de la hojarasca, tal como lo han sugerido Lambers y col. (2012). Por otra parte, la presencia de transportadores para péptidos en las raíces proteoideas también ha sido reportado en una especie de proteácea australiana (*Hakea actities*) (Paungfoo y col. 2009), característica que aún no ha sido explorada en ninguna de las proteáceas sudamericanas pero que sería importante en climas fríos donde la mineralización del nitrógeno del suelo es un proceso más lento comparado con sitios cálidos.

Los contenidos de potasio y aluminio también fueron más altos en el suelo cercano a las raíces que en el suelo sin influencia de las raíces de *E. coccineum* (Figura 4). El incremento de potasio podría estar asociado con los protones liberados por las raíces, ya que éstos pueden comportarse como cationes metálicos y reemplazar el potasio no intercambiable en la matriz del suelo, aumentando su disponibilidad en el suelo cercano a las raíces (Wang y col. 2011). El incremento del aluminio, por otro lado, podría estar relacionado con la exudación ácida alrededor de las raíces proteoideas, lo que haría que este elemento sea más soluble. El aluminio es un elemento tóxico y se encuentra en altas concentraciones en suelos volcánicos y, por lo tanto, la

exclusión de este elemento a través de la quelación con aniones orgánicos fuera de las raíces podría ser una estrategia beneficiosa para las especies con raíces proteoideas, como se ha observado para varias otras especies de plantas (Mariano y col. 2005).

Finalmente, como era de esperar, la acidificación fue mayor en el suelo cercano a las raíces en comparación con el suelo sin influencia de las raíces de *E. coccineum* (Figura 4), lo que concuerda con lo informado por otros trabajos realizados en condiciones tanto de invernadero (Zúñiga-Feest y col. 2010) como naturales (Delgado y col. 2015b). En general, la acidificación del suelo de la rizósfera bajo deficiencia de fósforo ha sido observada para muchas plantas (Dinkelaker y col. 1989; Neumann y col. 1999; Neumann & Römheld, 1999; Yan y col. 2002), aunque algunas proteáceas australianas (especies de *Banksia*, *Hakea* y *Dryandra*) no han producido un cambio significativo en el pH del suelo (Roelofs y col. 2001).

4.2. Diversidad de los ensamblajes bacterianos en suelos con y sin influencia de las raíces de *E. coccineum*

Si bien es ampliamente reconocido que muchos microorganismos del suelo son capaces de estimular el crecimiento de las plantas (Bulgarelli y col. 2013; Goh y col. 2013), es importante recordar que las plantas también estructuran la comunidad microbiana de su rizósfera. La comunidad microbiana de la rizósfera es el subconjunto de la comunidad microbiana del suelo influenciado por las propiedades químicas y físicas del suelo cercano a las raíces (Philippot y col.

2013). La composición y abundancia relativa de las especies rizosféricas difieren de las del suelo sin influencia de raíces (Kuske y col. 2002; Orlando y col. 2007; Garbeva y col. 2008; Farías y col. 2009; De Armas-Ricard y col. 2016), una clara evidencia de que las plantas tienen una gran influencia sobre las poblaciones microbianas que habitan las cercanías de las raíces (Marilley & Argano 1999), estimulando incluso su actividad (Haichar y col. 2014). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las plantas determinan la composición de las poblaciones de microorganismos no han sido aun completamente dilucidados. Los antecedentes disponibles indican que suelos con diferente composición florística, poseen una composición microbiana rizosférica muy similar (Buyer y col. 1999; Marschner y col. 2004).

Un posible factor determinante en la estructuración de la microbiota rizosférica es el aumento del área superficial proporcionado por las raíces proteoideas, los que proporcionarían micro-hábitats y aislamiento espacial limitando la competencia y permitiendo poblaciones microbianas altamente diversas y equitativas (Watt & Evans 1999; Ranjard & Richaume 2001; Sessitsch y col. 2001; Zhou y col. 2002). Por otro lado, la alta producción de ácidos carboxílicos por las raíces proteoideas puede proporcionar un mecanismo no sólo para la nutrición de las plantas, sino que también para estructurar la comunidad microbiana en la zona de la rizósfera (Watt & Evans 1999; Marschner y col. 2004; De Armas-Ricard y col. 2016). Así, la rizósfera es altamente dinámica con respecto a la disponibilidad de nutrientes y las propiedades físico-químicas, por lo que debe ser considerada como una

colección de hábitats distintos que varían espacial y temporalmente (Marschner y col. 2004), permitiendo de esta manera sucesiones de poblaciones microbianas rizosféricas (Philippot y col. 2013).

En este trabajo evaluamos la estructura de los ensamblajes bacterianos (i.e. la riqueza y los niveles relativos de abundancia) con y sin influencia de las raíces de *E. coccineum* a dos niveles, genético y metabólico, utilizando técnicas de *fingerprinting* (TRFLP y CLPP, respectivamente). Esto debido a que la estructura detectada a nivel genético no necesariamente es la misma que a nivel metabólico (Preston-Mafham y col. 2002; Orlando y col. 2007) y es imprescindible evaluar el papel de los microorganismos potencialmente activos con una respuesta rápida ante la entrada fluctuante de sustratos en microhábitats del suelo (Blagodatskaya & Kuzyakov 2013). Aunque las técnicas de *fingerprinting* tienen algunas limitaciones y sólo detectan los grupos más abundantes en una comunidad, son herramientas valiosas para evaluar cambios en la estructura de la comunidad microbiana (van Dorst y col. 2014; Almasia y col. 2016), demostrando un potencial similar a la pirosecuenciación para monitorear cambios estructurales de la comunidad (Gillevet y col. 2009; Cleary y col. 2012).

Nuestros resultados mostraron que tanto a nivel genético (Figura 6) como a nivel metabólico (Figura 11) se observó una separación de los ensamblajes bacterianos de los suelos con y sin influencia de las raíces de *E. coccineum*, siendo significativa solo la separación a nivel metabólico ($p=0,0014$). Es importante destacar que la aproximación utilizada para medir la estructura

comunitaria a nivel metabólico mide no sólo la fracción bacteriana activa sino también la potencialmente activa, siendo estas últimas aquellas capaces de cambiar rápidamente al estado activo ya que permanecen en estado de alerta para cuando los sustratos se hacen fácilmente disponibles (Blagodatskaya & Kuzyakov 2013). Se ha descrito que hasta un 90% de los microorganismos en el suelo estarían metabólicamente inactivos (Fierer & Lennon 2011), mientras que la fracción de microorganismos potencialmente activos puede llegar a contribuir entre 10 y 40% (hasta 60%) de la biomasa microbiana (Blagodatskaya & Kuzyakov 2013). Sin embargo, en suelos enriquecidos con una amplia cantidad de sustrato rico en energía, e.g. la rizósfera, la mayor parte de la comunidad microbiana está activa en lugar de latente (Hund & Schenk 1994), aunque se debe considerar la posibilidad de cierto grado de redundancia funcional (Allison & Martiny 2008).

Al analizar cuáles son las variables edáficas que influyen sobre la separación de ambos tipos de suelo, se determinó que el pH de extracto de suelo en agua (pH-H₂O) y el nitrógeno proveniente del nitrato (N-NO₃⁻) fueron los que tuvieron mayor influencia (Tabla 1 y Tabla 4). Anteriormente se ha descrito que el pH es, a nivel global, un buen descriptor de la diversidad y riqueza de ensamblajes bacterianos, considerándose que los suelos con pH neutro son más diversos y que con el aumento de la acidez la diversidad disminuye (Fierer & Jackson 2006). Además, varios autores informaron que los cambios en la estructura de los ensamblajes bacterianos en la rizósfera de las raíces proteoideas se deberían a diferencias en las tasas de exudación de

ácidos carboxílicos (Marschner y col. 2002, 2005; Weisskopf y col. 2005, 2008), los cuales producirían una acidificación del suelo que rodea las raíces. Los ácidos carboxílicos exudados permiten la movilización de nutrientes cerca de las raíces proteoideas, lo cual favorece la nutrición vegetal. Estos compuestos orgánicos son de bajo peso molecular y pueden ser rápidamente asimilados por los microorganismos del suelo (Strom y col. 2001; van Hees y col. 2005), por lo que se ha propuesto que la acidificación de la rizósfera constituiría también una estrategia para controlar la abundancia de bacterias (Weisskopf y col. 2006). Por otro lado, como ya se mencionó, las raíces proteoideas de *E. coccineum* podrían estar estimuladas por la deficiencia de nitrógeno del suelo (Piper y col. 2013) ya que estas plantas tienen alto contenido de nitrógeno en su follaje (Lusk & Corcuera 2011) que podría incorporarse al suelo a través de la descomposición de la hojarasca (Lambers y col. 2012).

Se ha reportado que las raíces proteoideas podrían facilitar la movilización y adquisición de nitrógeno a partir de fuentes orgánicas mediante la exudación de enzimas proteolíticas (Schmidt y col. 2003; Paungfoo-Lonhienne y col. 2008, 2009). Por lo tanto, la influencia del nitrato sobre la estructuración de los ensamblajes bacterianos podría estar relacionada con la exudación de las raíces que podrían aportar compuestos que sirven como fuentes de carbono y nitrógeno a microorganismos en general y aquellos relacionados con el ciclo del nitrógeno en particular (Orlando y col. 2010). En particular, la nitrificación activa bajo condiciones ácidas ha sido sugerida como evidencia de nitrificación heterotrófica (Focht & Verstraete 1977, Papen & von Berg 1998), aunque

autótrofos tolerantes al ácido también podrían ser responsables de la nitrificación en suelos ácidos (Pedersen y col. 1999; De Boer & Kowalchuk 2001; Islam & Chen 2007).

Al incluir en los análisis de los perfiles genéticos los ensamblajes bacterianos de los suelos asociados a los diferentes estadios de desarrollo de las raíces proteoideas (Figura 7), si bien no se observaron diferencias en los índices de diversidad (Figura 8), se puede observar que los ensamblajes que más se diferencian del resto son las asociadas a las raíces proteoideas juveniles, lo que podría explicarse porque desde ese estadio de desarrollo las raíces proteoideas comienzan la exudación de ácidos orgánicos. En general, las raíces proteoideas juveniles de *Lupinus albus* (lupino) y *E. coccineum* exudan malato y citrato, mientras que las maduras exudan principalmente citrato y las raíces senescentes tienen valores despreciables de exudación de ácidos orgánicos, pero mayores valores de actividad de la enzima fosfatasa ácida (Neuman y col. 1999, 2000; Delgado y col. 2013, 2015). Nuestros resultados difieren de los de Weisskopf y col. (2005), quienes encontraron que la proximidad a la raíz tuvo más influencia que los estadios de desarrollo de las raíces proteoideas de lupino. Las diferencias observadas podrían deberse a que los experimentos se realizaron con lupino, una planta herbácea no relacionada a *Notro*, y en ensayos de microcosmos de suelos arenosos ácidos, mientras que nuestro ensayo fue realizado bajo condiciones naturales. En otro estudio donde también se utilizaron plantas de lupino en ensayos de microcosmos de suelo arenoso, Marschner y col. (2002) sí encontraron diferencias en la estructura genética de

los ensamblajes del suelo dependiendo del estadio de desarrollo de las raíces proteoideas, siendo justamente los ensamblajes asociados a las raíces proteoideas juveniles los que más se separan del resto en los análisis multivariados. Weiskopf y col. (2005) discuten que las diferencias de los resultados obtenidos en ambos estudios se deberían a ciertas variaciones en las condiciones de cultivo, los análisis de datos y la recolección de las muestras. A pesar de estas diferencias, concluyen que el monitoreo de los cambios en los ensamblajes activos es más informativo que evaluar sólo los ensamblajes presentes (Weiskopf y col. 2005), coincidiendo con lo sugerido por otros autores (Preston-Mafham y col. 2002; Orlando y col. 2007, Blagodatskaya & Kuzyakov 2013).

En nuestro estudio incluimos el análisis de la estructura de los ensamblajes potencialmente activos, para lo cual primero se calcularon los parámetros cinéticos a partir de las curvas de utilización de las fuentes de carbono disponibles en las ecoplacas de BIOLOG® (Figura 10). Mediante este análisis se determinó que los suelos sin influencia de las raíces de *E. coccineum* presentaron menor tasa de consumo de las fuentes de carbono y alcanzaron una menor absorbancia total que los suelos con influencia de raíces. En relación al tiempo de latencia (λ), sólo se detectaron diferencias significativas al evaluar los ensamblajes asociados a los estadios semi-senescente y senescente de las raíces proteoideas, siendo estas últimas las que presentaron un mayor valor. Esto se explicaría ya que en el paso del estadio semi-senescente al senescente cambiaría la oferta de nutrientes desde los aportados por los

exudados radiculares a los liberados por la degradación de las raíces senescentes. En las zonas más senescentes de la planta, las fuentes de carbono son más recalcitrantes y las bacterias de rápido crecimiento que podemos encontrar en las zonas más nuevas, son reemplazadas por bacterias de lento crecimiento (Marilley & Aragno 1999).

Al analizar la estructura a nivel metabólico, el suelo sin influencia de las raíces se separa claramente de los suelos rizosféricos (Figura 12); y a su vez el suelo cercano a raíces se separa con respecto a los diferentes estadios de las raíces proteoideas, siendo entre estos últimos las raíces maduras y senescentes las que menos se parecen entre sí. Esto concuerda con lo observado por Weiskopf y col. (2005) para los ensamblajes activos asociados a las raíces proteoideas de lupino, quienes determinaron que la proporción de bacterias activas en los suelos aumentó con la proximidad a las raíces, siendo este factor más influyente que el estado de desarrollo de las raíces proteoideas.

Cabe destacar que carbohidratos, ácidos orgánicos, y aminoácidos son componentes de los exudados radiculares que estimulan respuestas quimiotácticas positivas y negativas en bacterias (Somers y col. 2004). Muchos de estos compuestos orgánicos liberados en la rizósfera quedan disponibles como sustratos para los microorganismos y son rápidamente asimilados en la biomasa microbiana (Jones & Darrah 1994; Ryan & Delhaize 2001; Gregory 2006). Estudios basados en perfiles de utilización de fuentes de carbono sugieren que los carbohidratos, los ácidos orgánicos y los aminoácidos serían los compuestos más discriminantes entre comunidades microbianas de la

rizósfera de diferentes plantas (Grayston y col. 1998) o entre diferentes estados radiculares (Baudoin y col. 2001). Entre las diferentes fuentes de carbono evaluadas en las ecoplacas (BIOLOG®), se encontró que las fuentes de carbono mayormente consumidas en los suelos rizosférico respecto al suelo sin influencia de raíces fueron carbohidratos (β -Metil-D-Glucósido, D-Xilosa, i-Eritritol, α -D-Lactosa, Glucosa-1-Fosfato), ácidos carboxílicos (Ácido D-Málico, Ácido α -Cetobutirico) y polímeros (α -Ciclodextrina, Glucógeno), entre otros (Figura 14 y Figura 15).

Algunos de estos compuestos orgánicos han sido ampliamente reconocidos como rizodepósitos liberados por las raíces de las plantas y/o por microorganismos rizosféricos (Dennis y col. 2010), pero la función específica de algunos de ellos en la interfase suelo-planta sigue siendo especulativa y no probada (Pinton y col. 2007). Muchas bacterias heterotróficas utilizan a menudo los carbohidratos como fuente de energía mientras que otras no sólo consumen fuentes como el glucógeno, sino que también lo producen como reserva de carbono cuando crecen en entornos desfavorables (Strange 1968). Los ácidos carboxílicos (e.g. ácido málico) son exudados tanto por plantas como por microorganismos y participan ampliamente en muchos procesos que se llevan a cabo en la rizósfera, incluyendo la adquisición de nutrientes y la desintoxicación de metales (Jones 1998). *E. coccineum*, así como otras proteáceas, exuda ácido cítrico y ácido málico principalmente por las raíces proteoideas juveniles y maduras, mientras que las raíces proteoideas senescentes no son exudativas (Neumann y col. 1999; Shane y col. 2004; Delgado y col. 2014). El mayor

consumo de fuentes de carbono en el suelo rizosférico podría estar relacionado con la mayor actividad de enzimas (e.g. β -glucosidasa y fosfatasa) detectada en la rizósfera en comparación con el suelo sin influencia de raíces (Marschner y col. 2005; Delgado y col. 2015). La exudación varía entre las raíces, y sustancias como ácidos orgánicos y fitosideróforos son liberados a través de la punta de la raíz (Marschner y col. 2004). Estos compuestos tienen distintas funciones en la rizósfera (Li y col. 2014) y sus niveles de exudación a través de las raíces varían con el estado de desarrollo de las raíces proteoideas y la edad de la planta (Neuman y col. 1999, 2000).

Finalmente, tanto la diversidad de las bacterias potencialmente activas como la riqueza de las fuentes de carbono que pueden utilizar fue menor en el suelo sin influencia de raíces comparado con los suelos rizosféricos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos estadios de desarrollo de las raíces proteoideas evaluadas. En cuanto a la uniformidad en el uso de las fuentes de carbono, las raíces proteoideas maduras fueron las que presentaron una mayor equidad, siendo ésta diferente significativamente de la presentada por el suelo asociado a las raíces proteoideas senescentes y por el suelo sin influencia de raíces (Figura 13). La diferenciación en la equidad del consumo de las fuentes de carbono entre estas dos etapas de desarrollo de las raíces proteoideas podría estar relacionada con componentes específicos exudados por las raíces maduras o con diferentes fuentes de carbono derivadas de la descomposición de las raíces senescentes.

5. CONCLUSIONES

- El pH de la rizósfera de *E. coccineum* es menor respecto al del suelo no-rizosférico; mientras que el nitrato, el potasio y el aluminio es mayor en la rizósfera. Sin embargo, los niveles de fósforo disponible no fueron significativamente diferentes entre ambos tipos de suelo, lo cual ha sido reportado también en otros experimentos naturales.
- Al inicio del desarrollo de las raíces proteoideas de *E. coccineum*, cambia la estructura de los ensamblajes bacterianos edáficos asociados, lo cual se evidencia por un cambio en los perfiles genéticos; mientras que durante el estadio maduro de desarrollo de sus raíces proteoideas, los ensamblajes bacterianos edáficos presentan una actividad metabólica potencial más homogénea.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allison SD, Martiny JBH. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11512-11519.
- Allsop N, Stock WD. 1993. Mycorrhizal status of plants growing in the Cape Floristic Region, South Africa. *Bothalia* 23: 91-104.
- Almasia R, Carú M, Handford M, Orlando J. 2016. Environmental conditions shape soil bacterial community structure in a fragmented landscape. *Soil Biology and Biochemistry* 103: 39-45.
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A. 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology* 37: 85-93.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR. 1990. *Ecology, individuals, populations and communities*, 2 Ed. Blackwell Scientific Publications Inc, Cambridge.
- Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. 2013. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 67: 192-211.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807-638.
- Buyer JS, Roberts DP, 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.
- Cleary DFR, Smalla K, Mendonça-Hagler LCS, Gomes NCM. 2012. Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *Plos One* 7: e29380.
- De Armas-Ricard M, Orlando J, Bustamante R, Carú M. 2016. Microbial communities of bulk and *Eschscholzia californica* rhizosphere soils at two altitudes in Central Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 16: 1-13.
- De Boer W, Kowalchuk GA. 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 853-866.

- Delgado M, Zúñiga-Feest A, Alvear M, Borie F. 2013. The effect of phosphorus on cluster-root formation and functioning of *Embothrium coccineum* (R. et J. Forst.). *Plant and Soil* 373: 765-773.
- Delgado M, Suriyagoda L, Zúñiga-Feest A, Borie F, Lambers H. 2014. Divergent functioning of *Proteaceae* species: the South American *Embothrium coccineum* displays a combination of adaptive traits to survive in high-phosphorus soils. *Functional Ecology* 28: 1356-1366.
- Delgado M, Zúñiga-Feest A, Borie F. 2015a. Ecophysiological role of *Embothrium coccineum*, a *Proteaceae* species bearing cluster roots, increasing phosphorus availability in its rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15: 307-320.
- Delgado M, Zúñiga-Feest A, Almonacid L, Lambers H, Borie F. 2015b. Cluster roots of *Embothrium coccineum* (*Proteaceae*) affect enzyme activities and phosphorus lability in rhizosphere soil. *Plant and Soil* 395: 189-200.
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72: 313-327.
- Dinkelaker B, Römheld V, Marschner H. (1989). Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell and Environment* 12: 285-292.
- Donoso C. 2006. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina, autoecología. Marisa Cúneo Ediciones, Valdivia. 678 pp.
- Drummond L, Maher W. 1995. Determination of phosphorus in aqueous solution via formation of the phosphor-antimonyl-molybdenum blue complex. Re-examination of optimum conditions for the analysis of phosphate. *Analytica Chimica Acta* 302: 69-74.
- Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. 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.
- Farías F, Orlando J, Bravo L, Guevara R, Carú M. 2009. Comparison of soil bacterial communities associated to actinorhizal, non-actinorhizal plants and the interspaces in the sclerophyllous matorral from Central Chile in two different seasons. *Journal of Arid Environments* 73: 1117-1124.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 626-631.
- Fierer N, Lennon J. 2011. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany* 98: 439-448.

- Focht DD & Verstraete W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. En: *Advances in microbial ecology*. Springer, US. pp. 135-214.
- Garbeva P, van Elsas JD, van Veen JA. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil* 302: 19-32.
- Garland JL, Mills AL. 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.
- Garland J. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 289-300.
- Gillevet PM, Sikaroodi M, Torzilli AP. 2009. Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing. *Fungal Ecology* 2: 160-167.
- Givnish TJ. 1994. Does diversity beget stability? *Nature*. 371: 113.
- Godoy R, Romero R, Carrillo R. 1994. Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 209-220.
- Goh CH, Veliz-Vallejos DF, Nicotra AB, Mathesius U. 2013. The impact of beneficial plant-associated microbes on plant phenotypic plasticity. *Journal of Chemical Ecology* 39: 826-839.
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369-378.
- Gregory PJ. 2006. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science* 57: 2-12.
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T, Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal* 2: 1221-1230.
- Haichar FZ, Santaella C, Heulin T, Achouak W. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* 77: 69-80.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- Hernesmaa A, Björklöf K, Kiikkilä O, Fritze H, Haahtela K, Romantschuk M. 2005. Structure and function of microbial communities in the rhizosphere of Scots pine after tree-felling. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 777-785.
- Hund K, Schenk B. 1994. The microbial respiration quotient as indicator for bioremediation processes. *Chemosphere* 28: 477-490.

- Insam, H., Goberna, M. 2004. Use of Biolog for the Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2 Ed, 4: 853-860.
- Islam A, Chen D, White RE. 2007. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 972-975.
- Jones DL, Darrah PR. 1994. Role of root-derived organic acids in the mobilisation of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil* 166: 247-257.
- Jones DL. 1998. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil* 205: 25-44.
- Kent AD, Triplett EW. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology* 56: 211-236.
- Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM, Belnap J. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1854-1863.
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98: 693-713.
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE. 2008. Plant nutrient acquisition strategies change with soil age. *Trends Ecology and Evolution* 23: 95-103.
- Lambers H, Brundrett MC, Raven JA, Hopper SD. 2010. Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. *Plant and Soil* 334: 11-31.
- Lambers H, Finnegan PM, Laliberté E, Pearse SJ, Ryan MH, Shane MW, Veneklaas EJ. 2011. Update on phosphorus nutrition in *Proteaceae*: phosphorus nutrition of proteaceae in severely phosphorus-impooverished soils: are there lessons to be learned for future crops? *Plant Physiology* 156: 1058-1066.
- Lambers H, Bishop JG, Hopper SD, Laliberté E, Zúñiga-Feest A. 2012. Phosphorus-mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems. *Annals of Botany* 110:329-348.
- Lamont BB. 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters - a review. *Plant and Soil* 248: 1-19.
- Lamont BB, Pérez-Fernández M, Rodríguez-Sánchez J. 2014. Soil bacteria hold the key to root cluster formation. *New Phytologist* 206: 1156-1162.
- Lamont BB, Pérez-Fernández M. 2016. Total growth and root-cluster production by legumes and proteas depends on rhizobacterial strain, host species and nitrogen level. *Annals of Botany* 118: 725-732.

- Li L, Tilman D, Lambers H, Zhang FS. 2014. Plant diversity andoveryielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytologist* 203: 63-69.
- Lusk CH, Corcuera LJ. 2011. Effects of light availability and growth rate on leaf lifespan of four temperate rainforest Proteaceae. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 269-277.
- Mariano ED, Jorge RA, Keltjens WG, Menossi M. 2005. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 157-172.
- Marilley J, 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 CH, Lieberei R, Crowley DE. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1437-1445.
- Marschner P, Neumann G, Kania A, Weiskopf L, 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, Crowley D, Yang CH. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261: 199-208.
- Marschner P, Grierson PF, Rengel Z. 2005. Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Applied Soil Ecology* 28: 191-201.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V. 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208: 373-382.
- Neumann G, Römheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211: 121-130.
- Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Romheld V, Martinoia, E. 2000. Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany* 85: 909-919.
- Neumann G, Martinoia E. 2002. Cluster roots: An underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* 7: 162-167.
- Olsen SR, Sommers LE. 1982. Phosphorus. En: *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Page AL, Miller RH, Deeney DR (eds.). ASA, Madison. pp. 403-430.

- Orlando J, Chavez M, Bravo L, Guevara R, Carú M. 2007. Effect of *Colletia hystrix* (Clos), a pioneer actinorhizal plant from the Chilean matorral, on the genetic and potential metabolic diversity of the soil bacterial community. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2769-2776.
- Orlando J, Alfaro M, Bravo L, Guevara R, Carú M. 2010. Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a "desert bloom" event. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1183-1188.
- Papen H, Von Berg R. 1998. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and Soil* 199: 123-130.
- Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Rentsch D, Robinson N, Christie M, Webb RI, Gamage HK, Carrol BJ, Schenk PM, Schmidt S. 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 4524-4529.
- Paungfoo-Lonhienne C, Schenk PM, Lonhienne TGA, Brackin R, Meier S, Rentsch D, Schmidt S. 2009. Nitrogen affects cluster root formation and expression of putative peptide transporters. *Journal of Experimental Botany* 60: 2665-2676.
- Pedersen H, Dunkin KA, Firestone MK. 1999. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ¹⁵N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry* 44: 135-150.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11: 789-799.
- Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P. 2007. *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 2° Ed. CRC press, New York.
- Piper FI, Baeza G, Zúñiga-Feest A, Fajardo A. 2013. Soil nitrogen, and not phosphorus, promotes cluster-root formation in a South American Proteaceae, *Embothrium coccineum*. *American Journal of Botany* 100: 2328-2338.
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 1-14.
- Ranjard L, Richaume A. 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152: 707-716.
- Ramírez C, Grinbergs J, Valenzuela J, San Martín C. 1990. Influencia de las raíces proteiformes en plántulas de *Gevuina avellana* Mol. *Bosque* 11: 11-20.

- Roelofs RFR, Rengel Z, Cawthray GR, Dixon KW, Lambers H. 2001. Exudation of carboxylates in Australian Proteaceae: chemical composition. *Plant, Cell and Environment* 24: 891-903.
- Ryan PR, Delhaize E. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 527-560.
- Sadzawka A, Carrasco M, Grez R, Mora ML, Flores H, Neaman A. 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Serie Actas INIA N° 34. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeler E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4215-4224.
- Schmidt S, Mason M, Sangtjean T, Stewart GR. 2003. Do cluster roots of *Hakea actities* (Proteaceae) acquire complex organic nitrogen? *Plant and Soil* 248: 157-165.
- Shane MW, De Vos M, De Roock S, Cawthray GR, Lambers H. 2003. Effect of external phosphorus supply on internal phosphorus concentration and the initiation, growth and exudation of cluster roots in *Hakea prostrata* R. *Br. Plant and Soil* 248: 209-219.
- Shane MW, Cramer MD, Funayama-Noguchi S, Cawthray GR, Millar AH, Day DA, Lambers H. 2004. Developmental physiology of cluster-root carboxylate synthesis and exudation in harsh hakea. Expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and the alternative oxidase. *Plant Physiology* 135: 549-560.
- Shane MW, Lambers H. 2005. Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil* 274: 101-125.
- Shannon C, Weaver W. 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana. 125 pp.
- Skene KR. 2000. Pattern formation in cluster roots: Some developmental and evolutionary considerations. *Annals of Botany* 85: 901-908.
- Smith SE, Smith FA. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62: 227-250.
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 205-240.
- Souto CP, Premoli AC, Reich PB. 2009. Complex bioclimatic and soil gradients shape leaf trait variation in *Embothrium coccineum* (Proteaceae) among

- austral forests in Patagonia. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 209-222.
- Stafford WHL, Baker GC, Brown SA, Burton SG, Cowan DA. 2005. Bacterial diversity in the rhizosphere of *Proteaceae* species. *Environmental Microbiology* 7: 1755-1768.
- Steubing L, Godoy R, Alberdi M. 2002. *Métodos de ecología vegetal*. 1 Ed. Editorial Universitaria, Chile.
- Strange RE. Bacterial "glycogen" and survival. 1968. *Nature*. 220: 606-607.
- Strom L, Owen AG, Godbold DL, Jones DL. 2001. Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 2125-2133.
- Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Siemann E. 1997. The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277: 1300-1302
- van Dorst J, Bissett A, Palmer AS, Brown M, Snape I, Stark J, Raymond B, McKinlay J, Ji M, Winsley T, Ferrari BC. 2014. Community fingerprinting in a sequencing world. *FEMS Microbiology Ecology* 89: 316-330.
- van Hees PAW, Jones DL, Nyberg L, Holmstrom SJM, Godbold DL, Lundstrom US. 2005. Modelling low molecular weight organic acid dynamics in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 517-531.
- Wang HY, Shen QH, Zhou JM, Wang J, Du CW, Chen XQ. 2011. Plants use alternative strategies to utilize nonexchangeable potassium in minerals. *Plant and Soil* 343: 209-220.
- Watt M, Evans JR. 1999. Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient of elevated atmospheric CO₂ concentration. *Plant Physiology* 120: 705-716.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Weisskopf L, Fromin N, Tomasi N, Aragno M, Martinoia E. 2005. Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance, function and community structure. *Plant and Soil* 268: 181-194.
- Weisskopf L, Abou-Mansour E, Fromin N., Tomasi N, Santelia D, Edelkott I, Neumann G, Aragno M, Tabacchi R, Martinoia E. 2006. White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition. *Plant, Cell & Environment* 29: 919-927.
- Weisskopf L, Le Bayon R, Kohler F, Page V, Jossi M, Gobat JM, Martinoia E, Aragno M. 2008. Spatio-temporal dynamics of bacterial communities

- associated with two plant species differing in organic acid secretion: a one-year microcosm study on lupin and wheat. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1772-1780.
- Yan F, Zhu Y, Muller C, Zorb C, Schubert S. 2002. Adaptation of H⁺ pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology* 129: 50-63.
- Yang JE, Skogley EO, Schaff BE, Kim JJ. 1998. Simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. *Soil Science Society of America* 62: 1108-1115.
- Zhou J, B Xia, DS Treves, LY Wu, TL Marsh, RV O'Neill, AV Palumbo, JM Tiedje. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 326-334.
- Zúñiga-Feest A, Delgado M, Alberdi M. 2010. The effect of phosphorus on growth and cluster-root formation in the Chilean Proteaceae: *Embothrium coccineum* (R. et J. Forst.). *Plant and Soil* 334: 113-121.
- Zúñiga-Feest A, Delgado M, Bustos A. 2014. Chapter 16: Cluster roots. En: Morte A, Varma A. (eds) *Root engineering: basic and applied concepts*. Springer, Berlin.
- Zúñiga-Feest A, Delgado M, Bustos-Salazar A, Ochoa V. 2015. The southern South American Proteaceae, *Embothrium coccineum* exhibits intraspecific variation in growth and cluster-root formation depending on climatic and edaphic origins. *Plant and soil* 396: 201-213.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van'tRiet K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1875-1881.