

Un giro a la producción convencional de los agrosistemas: alternativas sostenibles de producción vegetal

Tesis Doctoral

Marta Otero Nalban

Leioa, 2018

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Un giro a la producción convencional de los agrosistemas: alternativas sostenibles de producción vegetal

Tesis Doctoral

Marta Otero Nalbán

Dirigida por:
Dra. Miren K. Duñabeitia Aurrekoetxea
Dra. Isabel Salcedo Larralde

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

Leioa, 2018



*Then the traveler in the dark thanks you for
your tiny spark; he couldn't see which
way to go if you didn't twinkle so*

Ante la Ley

Franz Kafka

Ante la Ley hay un guardián. Hasta ese guardián llega un campesino y le ruega que le permita entrar en la Ley. Pero el guardián responde que en ese momento no puede permitirle el paso. El hombre reflexiona y le pregunta si podrá entrar más adelante.

—Es posible —dice el guardián—, pero ahora, no.

Las puertas de la Ley están abiertas, como siempre, y el guardián se ha hecho a un lado, de modo que el hombre se inclina para observar el interior. Cuando el guardián lo ve, se ríe y le dice:

—Si tanto te atrae, intenta entrar a pesar de mi prohibición. Pero recuerda esto: yo soy poderoso. Y yo soy sólo el último de los guardianes. De sala en sala irás encontrando guardianes cada vez más poderosos. Ni siquiera yo puedo soportar mirar al tercero.

El campesino no había previsto semejantes dificultades. Después de todo, la Ley debería ser accesible a todos y en todo momento, piensa. Pero cuando mira con más detenimiento al guardián, con su largo abrigo de pieles, su gran nariz puntiaguda, la larga y negra barba de tartar, se decide a esperar hasta que él le conceda el permiso para entrar. El guardián le da un taburete y le permite sentarse al lado de la puerta. Allí permanece el hombre días y años. Muchas veces intenta entrar e importuna al guardián con sus súplicas. Con frecuencia el guardián le formula pequeños interrogatorios. Le pregunta acerca de su país y de muchas otras cosas; pero son preguntas indiferentes, como las de los grandes señores, y al final le repite siempre que aún no le puede dejar entrar. El hombre, que estaba bien provisto para el viaje, invierte todo, por valioso que sea, para sobornar al guardián. Éste acepta todo, pero siempre repite lo mismo:

—Lo acepto para que no creas que has omitido algún esfuerzo.

Durante muchos años, el hombre observa ininterrumpidamente al guardián. Olvida a todos los demás guardianes y le parece que él es el único obstáculo que se opone a su acceso a la Ley. Durante los primeros años maldice su suerte en voz alta; cuando envejece, ya sólo murmura como para sí. Se vuelve pueril, y como en esos años que ha consagrado al estudio del guardián ha llegado a conocer hasta las pulgas de su cuello de pieles, también suplica a las pulgas que lo ayuden a persuadir al guardián. Finalmente su vista se debilita y ya no sabe si en la realidad está oscureciendo a su alrededor o si lo engañan los ojos. Pero en aquellas penumbras descubre un resplandor inextinguible que emerge de las puertas de la Ley. Ya no le queda mucho tiempo de vida. Antes de morir resume todas las experiencias de aquellos años en una pregunta, que nunca había formulado al guardián. Le hace una seña para que se aproxime, pues su cuerpo rígido ya no le permite incorporarse.

El guardián se ve obligado a inclinarse mucho, porque las diferencias de estatura se han acentuado con el tiempo, en desmedro del campesino.

—¿Qué quieres saber ahora? —pregunta el guardián—. Eres insaciable.

—Todos buscan la Ley —dice el hombre—. ¿Cómo es posible que en todos los años que llevo aquí, nadie más haya solicitado permiso para llegar a ella?

El guardián comprende que el hombre está a punto de expirar y para que sus oídos debilitados perciban sus palabras, le dice con voz atronadora:

—Nadie más podía entrar, porque esta puerta era sólo para ti. Cuando mueras, la cerraré.

AGRADECIMIENTOS

Bueno, ¡pues ya llegó el día!. Ésta es una de las primeras páginas de la tesis; sin embargo, es la última que escribo, aunque llevo pensando en ella mucho tiempo. Como os ha pasado a todos vosotros, supongo.

Como prólogo he elegido una parábola de Kafka que creo que viene muy bien como forma de introducir esta tesis, porque desde que empecé me he encontrado con muchos guardianes custodiando puertas abiertas pero, a diferencia del campesino, decidí atreverme a entrar. He mirado a muchos de esos guardianes a la cara y he sentido miedo al cruzar, pero al final estoy aquí. Y no me arrepiento. Ésta era mi oportunidad, mi puerta.

Todo comenzó con un máster que me hacía tantísima ilusión hacer, donde tuve la oportunidad de que me picase la “pulguita” de la curiosidad y me empezara a gustar la investigación. Y también donde pude conocer a buena gente que me ayudó y me sigue ayudando en el camino. Gracias Ana y Núria, por los ánimos que me disteis en su día y que me seguís dando hoy, por ayudarme mientras hacía el máster y la tesis, por cogerme el teléfono a las mil cuando tenía dudas sobre qué concentraciones poner, por escribirme aunque pasara el tiempo para preguntarme qué tal me iba. Ana, espero que en esta nueva etapa te vaya muy bien, porque os lo merecéis muchísimo y gracias por toda tu ayuda, no sabes lo valiosa que ha sido. Nuri, mi preparadora de caldo de tortuga, espero que lo siguiente que me cuentes es que tú también vas a leer la tesis, porque conozco poca gente que haya trabajado tanto como tú para conseguirlo.

Y luego volví a casa, buscando hacer la tesis con hongos. Y os encontré a vosotras Miren e Isabel. Gracias a esta experiencia he podido trabajar con muchísimos organismos diferentes y hacer un abanico inmenso de ensayos (no está aquí todo lo que es, pero es todo lo que está), aprendiendo a hacer muchísimas cosas que nunca pensé que aprendería. Y, si me permitís, el mayor valor que tiene esta tesis para mí es la cantidad de experimentos diferentes que contiene y la cantidad de conocimiento que me llevo. Gracias por haberme ayudado tanto, por hacer que el periodo experimental fuera una experiencia divertida y porque no me olvidara del gusto de cacharrear y de pinchar aquí y allá a ver qué sale. A ti Miren, te agradezco muchísimo que confiaras en mí para hacer la tesis, otra persona no lo hubiera hecho. Espero que quedes contenta con el resultado, porque he intentado devolverte esa confianza trabajando mucho. A ti Isabel, te agradezco tu fino trabajo, tanto a la hora de diseñar como de escribir, todo tu interés para que esta tesis quedase redonda, cuidando hasta el mas mínimo detalle. Y esas fotos tan preciosas de los hongos. Aquí también quiero añadir a Antonio, porque no me canso de agradecerle que te encargaras de la maquetación, porque gracias a tu esfuerzo es preciosa, ¡me encanta!.

En esta nuestra segunda casa he podido compartir muchos momentos (o más bien, me habéis tenido que sufrir) con sus “inquilinos”: Maite, Asier, Inma, Usue, Teresa, Ximena, Unai, Fernando, Marina, Izargi, Dani, Sergio, Jon, Fátima, Ander, Andrea, Julia, Iraide, Marlon, Theo, Rafa, Adrián y Mario. Habéis soportado mi música gutural con paciencia, os he abrasado a pitupreguntas sobre cómo se hacían las cosas ¡y aún así me seguís hablando!. Ahora en serio, todos vosotros me habéis enseñado a hacer algo que está en esta tesis, os lo agradezco de verdad, por haberos parado a explicarme y a solucionarme dudas cuando recurría a vosotros. Decid en rectorado de mi parte que os lo convaliden por otro título de doctor, porque deberían. Y a los que no lo tenéis, ya podéis ir a por *el papelito*.

No me puedo olvidar, y no me iba a olvidar, de mis compañeros de mi otra casa, el Kabi. Lorena, Laura, Igor, María, Ane y en especial de Joseba y Vero. Joseba, aunque coincidiéramos primero en la uni, no ha sido hasta trabajar con vosotros cuando te he podido empezar a conocer, por eso estás aquí. Gracias por todo Joseba, por todas las veces que me ayudaste en fisio, por esas charlas dignas de sesiones de terapia, por tus palmeras y cervezas quitapenas y por no perder el humor ni en el peor momento. Y tú Veri, gran química, gran actriz (de Óscar) y mejor persona; eres una máquina. No conozco persona más organizada, más detallista, ni más trabajadora que tú. También has estado ahí cuando he tenido dudas y en los momentos en los que se me hacía cuesta arriba. Por los buenos recuerdos de los últimos meses juntos quiero que sepáis que estáis muy presentes aquí. Como la loncha de queso en los sándwiches.

Agradacimientos

Sin embargo, no podría haber iniciado esta aventura sin el apoyo de mis padres, mis mejores patrocinadores. Confiasteis en que lo pudiera hacer y no dudasteis en apostar por mí. Si hoy estoy aquí es porque estabais siempre detrás, por lo que pudiera pasar, porque sabíais que era lo que quería hacer. Esta tesis ni siquiera habría empezado sin vosotros y es para vosotros. Mamá, papá, gracias. Ahora os toca leerla, que no os libráis.

Davi, contigo viví una de las mejores experiencias de mi vida, que fue ir a Madrid. Estudiamos juntos, volvimos juntos y empezamos la tesis juntos. Gracias por aquel día en que te quedaste fuera esperando a que te dijera que Miren me aceptaba en su laboratorio por lo nerviosa que estaba, como te quedaste esperando en Ciudad Universitaria. Estando aquí me has ayudado muchísimo, en todo. Desde los días en los que me ayudabas a machacar muestra o a hacer extracciones para que pudiera coger el último autobús, a los que me ayudabas a planificar experimentos o a los que intentabas que me relajara porque estaba agobiada. Empezamos juntos y lo terminaremos juntos, ¡porque no te queda nada!. Solamente gracias, por haber estado ahí sin ni siquiera pedírtelo. Por eso esta tesis es también para ti.

Y finalmente, quiero dar las gracias a mis niños, a todos ellos. Porque no tiene precio que siempre me recibáis contentos, me cuidéis y hagáis que se me olvide lo cansada que vuelvo o lo difícil que haya sido el día. Alguien me dijo una vez que la tesis se reduce a tiempo, al tiempo que inviertes en ella, y por invertir en ella os he descuidado a veces, perdiéndome cosas muy bonitas. Por eso, la dedicatoria va por vosotros, porque sois las estrellas que me guiais. Os quiero mucho.

Venga, y ahora toca que os la leáis, que para eso la habéis cogido ¿no? Jaja.

Gracias a todos :)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Laboratorio de Fisiología Vegetal perteneciente al Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU) y a mis directoras de tesis, la Dra. Miren Karmele Duñabeitia Aurrecoechea y la Dra. Isabel Salcedo Larralde por confiar en mí para la realización de este proyecto. Asimismo, me gustaría dar las gracias a las distintas entidades que han colaborado de una forma u otra en hacer posible la materialización de este trabajo:

- A la empresa Basalan S.A. (Diputación Foral de Bizkaia) por poner a nuestra disposición las instalaciones del vivero Martintxune, así como a su personal, especialmente a Kepa Txarterina, Ugaitz, Ander, Antonio, Edu y Odei, que se han preocupado por el bienestar de los cultivos y de mantenerlos en un estado óptimo para la realización de los ensayos, además de facilitarnos siempre el trabajo, colaborar en los muestreos y hacer del trabajo de campo un rato de disfrute en muy buena compañía.
- Al Servicio de Montes de la Diputación Foral de Bizkaia por la concesión de terrenos en Laukiz donde poder establecer las plántulas de pino para su seguimiento en campo.
- Al Centro Tecnológico y Forestal de la Madera (CETEMAS), en Asturias, por la extracción y el análisis del contenido hormonal de los pinos sometidos a infección.
- A los laboratorios de Neiker-Tecnalia por la determinación del contenido en nutrientes de suelo, planta y fruto.
- Al Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), en especial al Dr. José Luis Sanz, por acogerme en su laboratorio para la realización de la Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.
- Al Dr. Pablo Alvarado, de los laboratorios ALVALAB, por la secuenciación de los cultivos de bacterias y hongos.
- A Jasjor Sustainable Trade Company S.L, por creer en nosotras y por hacer posible, con su incondicional apoyo material e inmaterial, que esta locura saliera adelante.
- A Antonio Secilla, de nuevo, esta vez por el esfuerzo de maquetar esta tesis, por su inspiración para ilustrarla y por la paciencia que ha tenido conmigo al mandarle las correcciones.

Este trabajo de investigación ha recibido la financiación la Confederación de Forestalistas del País Vasco (US14/04) y del Gobierno Vasco a Grupos Consolidados de Investigación (IT-932-16).

RESUMEN

Desde la antigüedad hasta principios del siglo XIX, los métodos de fertilización se basaban en periodos de barbecho y en la aplicación de abonos orgánicos animales y vegetales. La revolución industrial trajo consigo un aumento en la población mundial y una creciente demanda de alimentos, sentando las bases del abonado moderno basado en los fertilizantes convencionales que continúa hasta nuestros días. Además del coste medioambiental que supone su síntesis, se ha detectado que su aplicación no resulta del todo eficiente debido a pérdidas por lixiviación o desnitrificación, y que promueven la aparición de plagas, incrementando la susceptibilidad de las plantas a la infección por fitopatógenos.

En la actualidad, la filosofía de la fertilización orgánica, que se centra en prácticas basadas en los ciclos ecológicos, cuya finalidad es frenar el impacto ambiental de la agricultura intensiva, proporcionando una sostenibilidad del sistema a la largo plazo y reduciendo al mínimo el uso de recursos no renovables, está cobrando gran importancia. Los insumos procedentes de restos vegetales están compuestos por una amplia gama de microorganismos, que al actuar de forma sinérgica estimulan los procesos naturales implicados en la asimilación de nutrientes, beneficiando el crecimiento de la planta y mejorando su tolerancia a los estreses. En el caso del presente trabajo, el insumo empleado se trata de un té de compost aireado o TCA con un bajo porcentaje de nitrógeno (0,15%) y potasio (0,46%), pero abundante en microorganismos, entre los que destacan géneros como *Bacillus* (40,4%), *Ochrobactrum* (24,5%), *Pseudomonas* (17,7%), *Gordonia* (15,8%) y *Serratia* (1,6%) alcanzando una concentración de $2,5 \cdot 10^6$ mesófilos aerobios por gramo de insumo.

Para comprobar la efectividad del TCA como biofertilizante se han realizado estudios bajo diferentes condiciones, tanto en laboratorio (microcosmos), como en campo (mesocosmos) en los que se ha observado que: 1) es un producto no fitotóxico; 2) favorece el desarrollo general del cultivo, en especial del sistema radical; 3) mejora la disponibilidad de nutrientes para la planta; 4) conduce a un mayor contenido en pigmentos fotosintéticos, un aumento significativo de la tasa fotosintética y un rendimiento cuántico mayor; 5) mejora el sistema de defensa de la planta, fortaleciéndole frente al ataque de patógenos; 6) no altera las condiciones físico-químicas del suelo y 7) no altera la diversidad microbiana del suelo e induce sinergias entre la microbiota, favoreciendo al sistema suelo-planta.

El éxito del TCA reside, precisamente, en que contiene una población microbiana específica, principalmente compuesta por especies de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Ochrobactrum* y fúngicos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, englobados bajo el nombre genérico de Promotores del crecimiento vegetal (PGPs). Todos ellos se caracterizan por su capacidad de estimular el crecimiento vegetal por medio de la producción de hormonas, principalmente el Ácido Indolacético y las Giberelinas; la acción del enzima ACC desaminasa; la solubilización de sales de fósforo y potasio y la fijación de nitrógeno; así como por su capacidad de estimular la Resistencia Sistémica Inducida.

Estos ensayos han sido llevados a cabo principalmente en laboratorio y en pequeñas parcelas de uso experimental, con unos resultados prometedores; sin embargo, deben ser contrastados y corroborados en ensayos a gran escala y bajo diferentes condiciones edafoclimáticas.

SUMMARY

From the ancient times to the beginning of the 19th century, fertilization methods were based on fallow periods followed by the application of organic fertilizers of animal and plant origin. The Industrial Revolution brought along with an increase in world population and an increasing demand for food, laying the foundations of the modern conventional fertilizers, which continues nowadays. In addition of environmental impact that implies their synthesis, it has been detected that their application is not completely efficient, due to losses by leaching or denitrification; and that promote the appearance of pests, increasing plant susceptibility to infection by phytopathogens.

Currently, the organic fertilization philosophy, which focuses on practices based on ecological cycles, of which purpose is to curb the environmental impact of intensive agriculture, providing a long-term sustainability of the system and minimizing the use of non-renewable resources, is becoming of great importance. The fertilizers from plant remains are composed of a wide range of microorganisms, which by acting synergistically, stimulate the natural processes involved in the assimilation of nutrients, benefiting plant growth and improving its tolerance to stress. In this work, the fertilizer used is an aerated compost tea or ACT limited in nitrogen (0.15%) and potassium (0.46%), but abundant in microorganisms, among which stand out genera such as *Bacillus* (40.4%), *Ochrobactrum* (24.5%), *Pseudomonas* (17.7%), *Gordonia* (15.8%) and *Serratia* (1.6%), reaching a concentration of $2.5 \cdot 10^6$ aerobic mesophiles per gram.

To verify the effectiveness of the ACT as a biofertilizer, several studies have been conducted under different conditions, both in laboratory (microcosms) and field environments (mesocosms), in which it has been observed that: 1) is a non-phytotoxic product; 2) favors the general development of the crop, especially the root system; 3) improves the nutrient availability for the plant; 4) leads to a higher content of photosynthetic pigments, a significant increase in photosynthesis rate and greater quantum yield; 5) improves the plant defense system, strengthening it against the attack of pathogens; 6) does not alter the physical-chemical conditions of the soil and 7) does not alter the edaphic microbial diversity and induces synergies between the microbiota, favoring the soil-plant system.

The success of the ACT lies, precisely, in the fact that contains a specific microbial population, mainly composed of species of the bacterial genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Ochrobactrum* and fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium*, encompassed under the generic name of Plant Growth Promoters (PGPs). All of them are characterized by their ability to stimulate plant growth through the hormone production, mainly Indoleacetic acid and Gibberellins; the action of the ACC deaminase enzyme; solubilization of phosphorus and potassium salts and nitrogen fixation; as well as for its ability to stimulate the Induced Systemic Resistance.

These experiments have been carried out mainly in laboratory and in small plots of experimental use, with promising results. However, they must be contrasted and corroborated in large-scale experiments under different edaphoclimatic conditions.

ÍNDICE

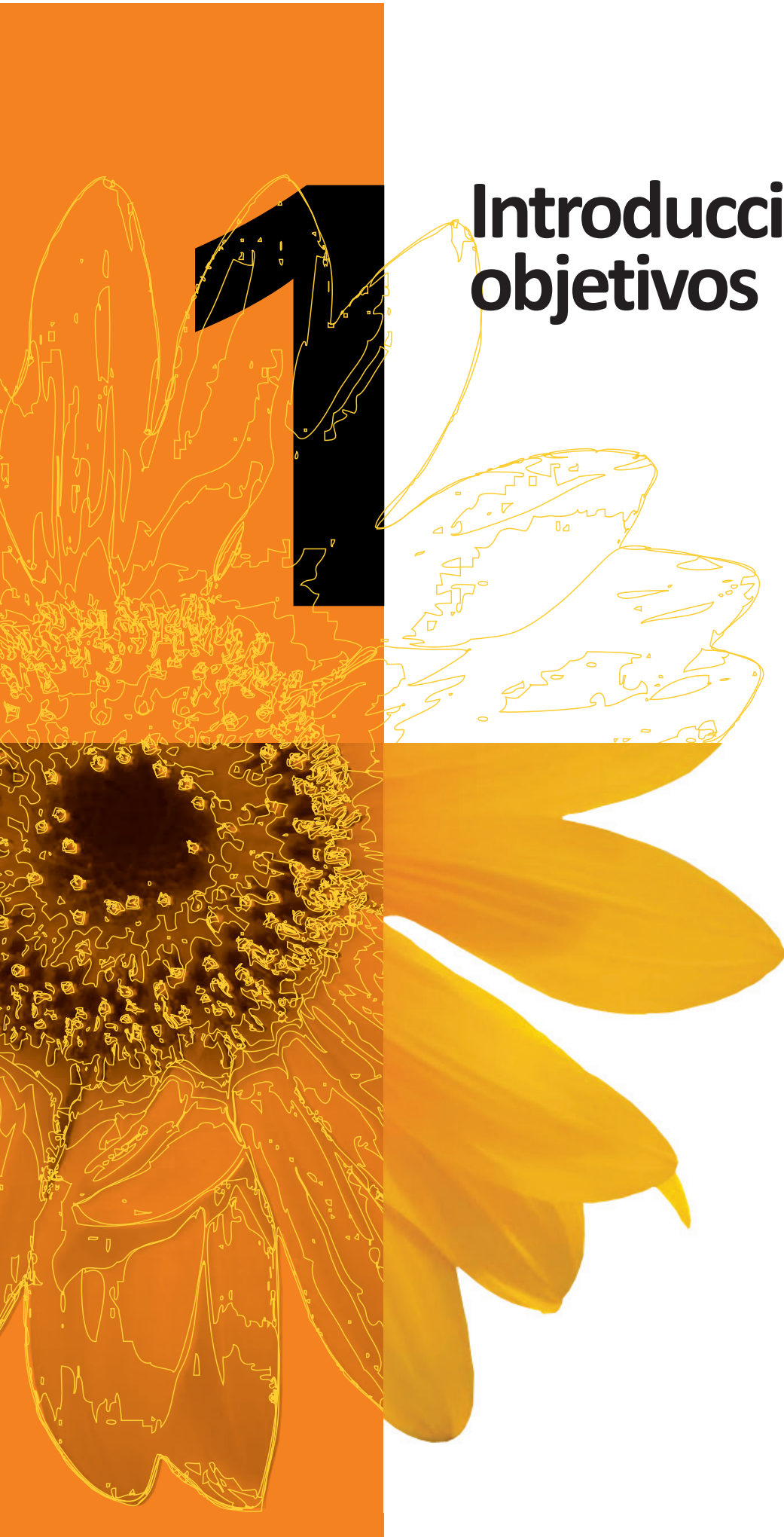
Capítulo 1. Introducción y objetivos	24
1.1. La fertilización a lo largo de la historia.....	26
1.2. La problemática de los fertilizantes convencionales	26
1.3. Definición de un suelo sano	28
1.4. La microbiota de los suelos	30
1.5. Especies vegetales de interés comercial	32
1.5.1. A nivel extensivo: Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	32
1.5.2. A nivel intensivo bajo plástico: Pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	33
1.5.2.1. La importancia de los nutrientes	34
1.5.3. A nivel forestal: Pino insignie, pino de monterrey (<i>Pinus radiata</i> D. Don).....	35
1.5.3.1. <i>Fusarium circinatum</i> , agente causante del chancro resinoso de los pinos.....	36
1.5.3.2. Protocolo de actuación en vivero.....	38
1.5.3.3. Mecanismos de defensa de las plantas frente a la infección por patógeno	38
1.6. Fertilización convencional vs. Fertilización orgánica: Un acercamiento hacia la sostenibilidad ...	40
1.6.1. La alternativa de los insumos orgánicos: Los bioinsumos	42
1.6.2. El caso particular del té de compost	43
1.7. Hipótesis y objetivos del presente trabajo.....	45
Capítulo 2. Materiales y métodos	46
2.1. Caracterización del insumo objeto de estudio	48
2.2. Especies seleccionadas.....	49
2.3. Diseño experimental y condiciones del cultivo	51
2.4. Parámetros evaluados en planta	55
2.4.1. Parámetros biométricos	55
2.4.2. Parámetros de producción	55
2.4.3. Contenido en nutrientes.....	55
2.4.4. Fluorescencia de la clorofila y contenido en pigmentos	55
2.4.5. Actividad enzimática	56
2.4.5.1. Fosfatasa <i>in vivo</i>	56
2.4.5.2. Nitrato Reductasa <i>in vivo</i>	56
2.4.5.3. Glutamina Sintetasa <i>in vitro</i>	56
2.5. Inoculación con <i>Fusarium circinatum</i> y evaluación de la susceptibilidad.....	57
2.5.1. Determinación del rango de temperatura	57
2.5.2. Valoración del efecto del TCA en el crecimiento <i>in vitro</i> del patógeno	57
2.5.3. Inoculación de las plantas	57
2.5.4. Evaluación de la respuesta de la planta tras la inoculación	58
2.5.5. Cuantificación de la cantidad de patógeno presente en los tejidos de <i>P. radiata</i>	58
2.5.6. Cuantificación de la inducción de la expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógenos	60
2.5.6.1. Extracción y purificación de las muestras de ARN	60
2.5.6.2. Tratamiento con Desoxirribonucleasa o DNAsa	60
2.5.6.3. Retrotranscripción y preparación de la reacción de q-PCR.....	61
2.6. Evaluación del efecto del TCA a nivel de microbiota	62
2.6.1. Preparación de las muestras de suelo.....	62
2.6.2. Determinación de parámetros físico-químicos.....	62
2.6.3. Determinación de la actividad enzimática de la microbiota	62
2.6.4. Determinación del perfil metabólico del suelo	63

2.6.5. Estimación de la diversidad microbiana mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	63
2.6.5.1. Amplificación del 16S/18S	63
2.6.5.2. Reacción de PCR anidada.....	64
2.6.5.3. Purificación del producto de la amplificación y resolución de las bandas en gel desnaturalizante	65
2.6.5.4. Recuento del número de especies y estimación indirecta de la biomasa microbiana..	65
2.7. Análisis estadístico	65
Capítulo 3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA	66
3.1. Bioensayos de germinación	68
3.2. Capacidad fijadora y solubilizadora en cultivo puro	68
3.3. Efectividad del bioinsumo	72
3.3.1. Características físico-químicas del sustrato.....	74
3.3.2. Crecimiento de la planta	74
3.3.3. Riqueza específica de la microbiota del suelo	74
Capítulo 4. Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato	78
4.1. Efectividad según el tipo de sustrato	80
4.1.1. Características físico-químicas del sustrato.....	80
4.1.2. Actividad metabólica del sustrato.....	81
4.1.3. Perfil metabólico del sustrato	81
4.1.4. Crecimiento de la planta	83
4.2. Efectividad según la asepsia del sustrato	84
4.2.1. Crecimiento y contenido en pigmentos.....	84
4.2.2. Características morfohistológicas más relevantes	85
Capítulo 5. Valoración de la calidad del sistema suelo-planta (hortícola) en función de la fertilización en condiciones de campo	94
5.1. Cultivo de pimiento.....	96
5.1.1. Características físico-químicas del sustrato.....	96
5.1.2. Actividad metabólica del sustrato.....	97
5.1.3. Perfil metabólico del sustrato	97
5.1.4. Crecimiento de la planta	99
5.1.4.1. Crecimiento en fase de semillero	99
5.1.4.2. Crecimiento en bancal	102
5.1.5. Producción.....	106
Capítulo 6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal	108
6.1. Características físico-químicas del sustrato.....	110
6.2. Actividad metabólica del sustrato.....	110
6.3. Perfil metabólico del sustrato	110
6.4. Evaluación de la planta producida en vivero	111
6.5. Caracterización in vitro del crecimiento de <i>Fusarium circinatum</i>	113
6.6. Nivel de susceptibilidad a <i>F. circinatum</i> en función del tipo de fertilización aplicado en fase de vivero	115
6.7. Caracterización de la planta trasplantada a campo desde vivero	130
Capítulo 7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo	132
7.1. Cuantificación de los microorganismos del suelo	134
7.1.1. Proporción de especies bacterianas (excluidas las del género <i>Pseudomonas</i>)	134

7.1.2. Proporción de especies bacterianas del género <i>Pseudomonas</i>	136
7.1.3. Proporción de especies fúngicas	139
7.2. Análisis de la comunidad microbiana del suelo	145
7.3. Guía fenotípica de las especies más representativas.....	149
7.3.1. Bacterias.....	149
7.3.2. <i>Pseudomonas</i> spp.	153
7.3.3. Hongos	155
Capítulo 8. Discusión general	164
8.1. Singularidades del té de compost	166
8.2. Efecto en planta	167
8.3. Efecto en suelo	176
8.4. Consideraciones finales y perspectivas futuras	182
Capítulo 9. Conclusiones	184
Capítulo 10. Bibliografía	188
Capítulo 11. Anexos	210
Anexo I. Tablas de datos de actividades enzimáticas.....	212
Anexo II. Composición de tampones y medios de cultivo utilizados	214



Introducción y objetivos



1.1. LA FERTILIZACIÓN A LO LARGO DE LA HISTORIA

El empleo de abonos o fertilizantes ha acompañado siempre a la agricultura desde sus inicios, hace 5.000 años. En las antiguas culturas de Egipto, China, Asia Occidental y Sudamérica ya utilizaban formas primitivas de abonado para incrementar la fertilidad del suelo (Finck, 1988). Los abonos son productos que, aplicados directa o indirectamente sobre el suelo, favorecen el crecimiento de las plantas, aumentan su producción y mejoran su calidad. En la antigüedad se complementaban los periodos de barbecho con diferentes abonos para mejorar la fertilidad del suelo: estiércol de animales de granja, residuos animales (sangre), residuos fecales humanos y de animales domésticos, lodos de ríos y lagunas, material del suelo de los bosques, algas y fauna marina, cenizas, margas, calizas, yeso y abonos verdes (restos vegetales compostados). Esta última práctica de abonado se basa en la Teoría del humus de Aristóteles: “La planta se alimenta de sustancias húmicas que absorbe por las raíces; tras su muerte, la planta se convierte de nuevo en humus y de ahí que las sustancias húmicas sean abonos”.

Estos métodos iniciales de abonado se mantuvieron vigentes hasta principios del siglo XIX. Pese a los esfuerzos invertidos en mejorar la producción de las cosechas, estos aumentos no eran significativos, además de variables, e incluso con la pérdida total de la cosecha que traía como consecuencia empobrecimiento y hambrunas. El último registro existente de grandes pérdidas por causas naturales se remonta a 1846, siendo el desencadenante de la revolución alemana de 1848 (Finck, 1988), o la Gran hambruna irlandesa.

Coincidiendo con el inicio de la química moderna y el entendimiento del metabolismo de las plantas, se sentaron las bases del abonado moderno basado en los fertilizantes convencionales, de síntesis, o NPK. Se descubrió que el nitrógeno, junto con el fósforo y el potasio, era uno de los elementos esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas, y comenzó a incorporarse a los cultivos en forma de fertilizante químico con el fin de aumentar la productividad y abastecer de alimento a las poblaciones humanas (Smil, 1999). En 1908, los alemanes Fritz Haber y Carl Bosch comenzaron a desarrollar el proceso de síntesis de amoníaco a partir de hidrógeno y nitrógeno sometido a elevadas presiones, sin embargo, no fue hasta las décadas de 1920 y 1930 cuando se comenzó a analizar su eficacia en los diferentes suelos y cultivos, pareciendo

posible aumentar la producción de una manera ilimitada y ser garantía de éxito. Ya desde entonces se observaban ciertos problemas acompañantes a este tipo de fertilización: no siempre producía el efecto esperado y en la mayoría de los casos ocasionaba desequilibrios en la nutrición de las plantas, teniendo unos efectos desfavorables, y apareciendo casos de sobredosificación. Además, no eran inocuos para las plantas y los animales, perjudicaban la calidad de los productos y en determinadas ocasiones aparecían enfermedades desconocidas. Debido a la necesidad de remediar estos inconvenientes, el equipo de Hoagland, en Estados Unidos, estudió durante años qué elementos eran los que necesitaban las plantas para crecer e incrementaron la lista de nutrientes necesarios, pasando de tres (NPK) a nueve (Mn, B, Zn, Cu, Mo y Cl), señalando la importancia de los oligoelementos.

Es a partir de este momento cuando la humanidad asiste a lo que se conoce como modelo de fertilización de síntesis, que pervive hasta nuestros días y que permite un abastecimiento de alimento a la población, así como su crecimiento exponencial.

1.2. LA PROBLEMÁTICA DE LOS FERTILIZANTES CONVENCIONALES

Ya en 2005, la demanda mundial de nitrógeno era de 100 T por año (Erisman *et al.*, 2008), demanda que crece exponencialmente a lo largo del tiempo (1,8% anual hasta 2018) y esto implica a su vez el consumo de formas no renovables de energía para la síntesis de dichos fertilizantes, ya que se necesitan aproximadamente 1,3 T de combustible para producir 1 T de nitrógeno mediante el proceso industrial de Haber-Bosch (Martínez-Viera *et al.*, 2010). Además del coste ambiental que supone su síntesis, se ha detectado que su aplicación no resulta del todo eficiente, ya que únicamente un 50% del N inorgánico aplicado acaba siendo transformado por las plantas en N orgánico (Greenwood, 1990, Ziegler *et al.*, 1992), siendo el resto inmovilizado por arcillas y los organismos del suelo, o desplazado tanto por lixiviación como por procesos de nitrificación y desnitrificación, contribuyendo a la contaminación atmosférica y de acuíferos (Figura 1.1).

Diversos autores han señalado a la aplicación de fertilizantes químicos como origen principal del lavado de nitratos y de otros iones como cloruros y sulfatos en los suelos destinados a la agricultura (Foster *et al.*, 1982, Greenwood, 1990, Goulding, 2000, Olarewaju *et al.*, 2009, Mahdi *et al.*, 2010, Martínez-Viera *et al.*, 2010). Se calcula que en las épocas en las que se adicionaban

fertilizantes orgánicos, la pérdida de nitrato por lixiviación no sobrepasaba los 25 Kg N/ha y, sin embargo, llega a los 40 Kg N/ha en aquellos suelos fertilizados con el uso de formas inorgánicas (Foster *et al.*, 1982). En regiones de clima oceánico (con temperaturas suaves y abundantes precipitaciones) el lixiviado es principalmente un fenómeno invernal, que comienza en otoño cuando los suelos alcanzan su capacidad de campo y finaliza en primavera cuando comienzan a secarse. En regiones más frías o aquellas de clima continental, donde los suelos se encuentran congelados durante la mayor parte del invierno, este fenómeno ocurre en primavera, cuando la nieve se deshíela.

La desnitrificación es otro problema al que se enfrenta un suelo fertilizado de forma inorgánica o convencional. Implica la conversión de nitrato a nitrógeno molecular (N_2) y óxido nitroso (N_2O), gas de efecto invernadero, 150 veces más efectivo que el dióxido de carbono como gas de efecto invernadero. Este fenó-

meno ocurre principalmente cuando el suelo está húmedo y templado, ya que permite desarrollar una actividad microbiana mayor. Asimismo, habría que tener en cuenta el fenómeno de volatilización del amonio en aquellos campos fertilizados en exceso con químicos que combinan la aplicación de N total con NO_3^- y NH_4^+ (Powlson, 1993, Di & Cameron, 2002).

Los ecosistemas naturales son sistemas abiertos desde un punto de vista termodinámico, sin embargo, los agroecosistemas implican la sustitución de un ecosistema por otro y por ello es importante controlar la entropía del sistema. La adición de fertilizantes de naturaleza química desequilibra la entropía de los gases de estos ecosistemas modificados (CO_2 , NO, NO_2 , N_2O , NH_3 y H_2O) implicando la pérdida de automantenimiento del sistema (Addiscott, 1995, Martínez-Viera *et al.*, 2010) y una acumulación de los subproductos en el medio ambiente (Powlson, 1993, Jenkinson, 2001). Esta alteración se extiende hasta la fauna, para la que

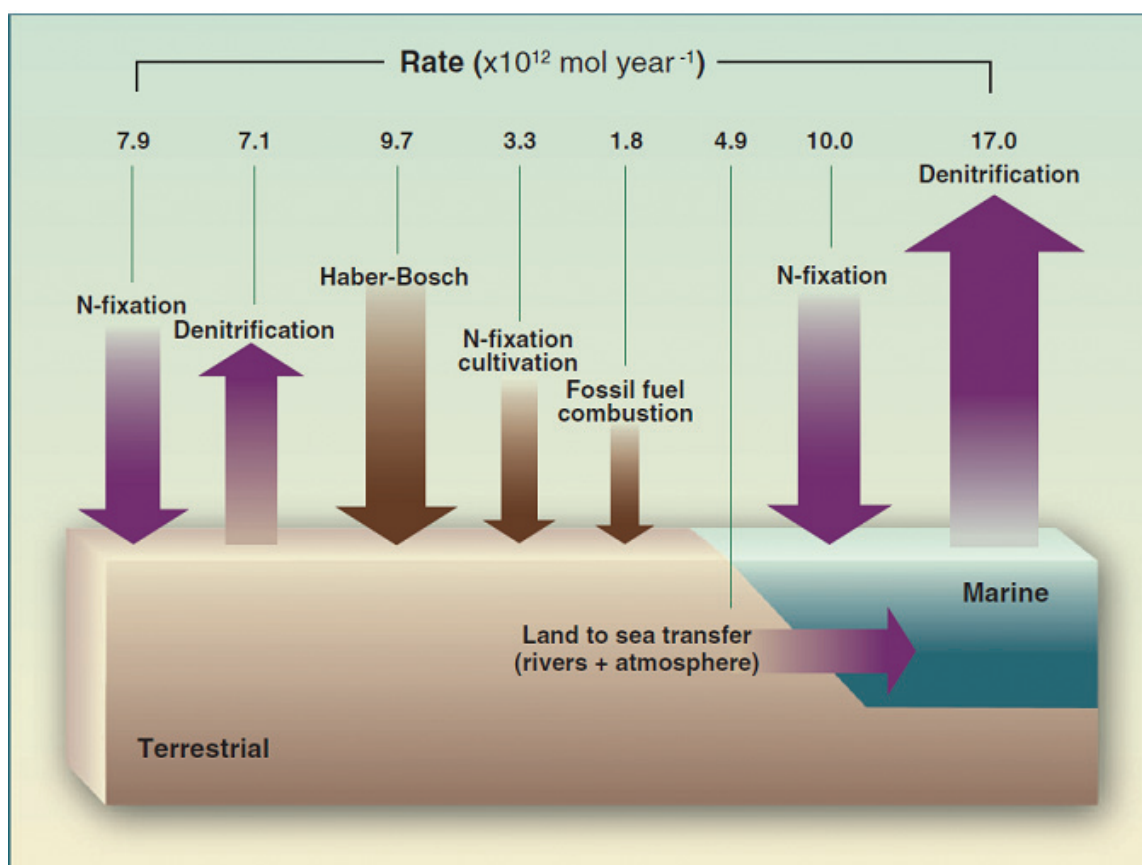


Figura 1.1. Tasas de flujo del nitrógeno actual (el tamaño de la flecha es proporcional al flujo). Las flechas marrones indican intervención antropogénica. Tomado de Canfield *et al.* (2010).

el nitrato resulta un agente tóxico, llegando a alterar estructuralmente las comunidades, eliminando o desplazando poblaciones sensibles, eutrofizando las masas de agua (Hecnar, 1995) y llegando incluso a afectar a la salud humana; la mayor parte del nitrato que ingerimos procede de los vegetales (83%), especialmente en las hortalizas de hoja verde, y su reducción a nitritos tras su ingesta puede causar metahemoglobinemia, un trastorno sanguíneo que vuelve incapaz a la hemoglobina para transportar oxígeno en sangre (Jenkinson, 2001), razón por la cual se han establecido a nivel comunitario límites máximos de nitratos en vegetales de consumo (Reglamento 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006) y se aboga por aplicar códigos de buenas prácticas agrícolas que limiten los niveles de contaminantes en los alimentos.

En cuanto a los suelos, su capacidad para reciclar los nutrientes es esencial para el mantenimiento de la fertilidad de los ecosistemas terrestres y, en gran medida, los microorganismos son los responsables de dicha fertilidad del suelo, debido a su implicación en los ciclos de los nutrientes. Sin embargo, la microbiota edáfica resulta muy susceptible a los diferentes usos y manejos aplicados sobre el suelo, siendo la estructura y abundancia de las comunidades bacterianas y fúngicas dependientes de los parámetros fisicoquímicos del mismo (Leita *et al.*, 1999, Tedersoo *et al.*, 2014), por lo que cualquier alteración afecta a la biodiversidad microbiana, al perfil fisiológico del suelo y, en consecuencia, al crecimiento vegetal.

La alteración de las comunidades originales en el suelo y el aporte de grandes cantidades de macronutrientes, ambas características subsiguientes a la aplicación abusiva de los fertilizantes de síntesis, promueven la aparición y la expansión de plagas e incrementan la susceptibilidad de las plantas a la infección por hongos fitopatógenos (Konishi *et al.*, 2001, Bengtsson *et al.*, 2005); asimismo dificultan en gran medida el establecimiento de asociaciones con hongos simbioses, debido a que las plantas no las necesitan por disponer en el suelo de un exceso de nutrientes de fácil asimilación (Gryndler *et al.*, 2006). Hace décadas se comenzaron a usar plaguicidas de síntesis para remediar el crecimiento exponencial de las plagas en este tipo de cultivos, lo que, debido a la aplicación prolongada, ha conducido al desarrollo de resistencias por parte de estos organismos patógenos y, en consecuencia, la industria se ve obligada, cada cierto tiempo, a diseñar nuevos compuestos por la pérdida de eficacia. Algunos de los empleados, como el DDT y el lindano, son altamente recalitrantes y hoy día, pese a su prohibición,

permanecen en los suelos donde fueron aplicados. El peligro inherente a estos compuestos es la contaminación del suelo y de las aguas de drenaje, su presencia en los tejidos vegetales y su entrada en la cadena trófica, siendo finalmente ingeridos por los humanos (Carvalho, 2006, Hildebrandt *et al.*, 2008).

1.3. DEFINICIÓN DE UN SUELO SANO

Un suelo sano se define como aquel sistema que tiene resiliencia al estrés, gran diversidad biológica, y complejos niveles de ciclos internos de nutrientes (van Bruggen & Semenov, 2000). El término *sano* se emplea también a la hora de hablar de agricultura sostenible para describir la calidad del suelo. Un manejo responsable es importante para todos los sistemas agroforestales, ya que se ha demostrado que estos sistemas son especialmente sensibles a la degradación y que un mantenimiento pobre causa erosión, pérdida de materia orgánica, contaminación, compactación y excesiva salinidad (Kibblewhite *et al.*, 2008). La adición de fertilizantes con alto contenido en nitrógeno y fósforo provee a las plantas de nutrientes rápidamente asimilables, incrementando la producción, pero no mejoran la salud del suelo, pudiendo dañarlo a largo plazo (Vieira & Almeida, 2016). Por el contrario, la filosofía de la fertilización orgánica se centra precisamente en prácticas basadas en los ciclos ecológicos, cuya finalidad es frenar el impacto ambiental de la industria intensiva, proporcionando una sostenibilidad del sistema a la largo plazo y reduciendo al mínimo el uso de recursos no renovables (Gomiero *et al.*, 2011).

Para determinar la calidad de un suelo se ha atendido tradicionalmente a diferentes parámetros físico-químicos, ya que muchas de las reacciones que ocurren en el mismo implican intercambio de electrones y protones. Este intercambio se suele determinar mediante parámetros como el pH, la conductividad eléctrica (CE) y el potencial de oxidación-reducción (Eh). La conductividad eléctrica permite caracterizar varias propiedades del suelo, como la capacidad de intercambio catiónico, la salinidad, la concentración de nutrientes, la humedad residual, la textura del suelo y el tipo de vegetación que puede asentarse en él (Husson, 2013, Hulisz *et al.*, 2016) y el potencial de oxidación-reducción se ve influenciado por la presencia de materia orgánica, de gran capacidad reductora, y proporciona información sobre la actividad biológica discreta del mismo (Tabla 1.1). Por ejemplo, el proceso de desnitrificación se ve favorecido por debajo de +200 mV y el de nitrificación, por encima de +200mV (Bailey & Beauchamp, 1971, Golterman, 1995). Altos valores de este parámetro

Tabla 1.1. Procesos metabólicos microbianos y aceptor final de electrones en función del grado de oxigenación y del rango de potencial redox del suelo. Modificado de DeLaune & Reddy (2005).

Estado del sedimento	Anaerobio					Aerobio
Estado redox	Altamente reducido	Reducido		Moderadamente reducido		Oxidado
Aceptor de electrones	CO ₂	SO ₄ ²⁻	Fe ³⁺	Mn ⁴⁺	NO ₃ ⁻	O ₂
Metabolismo microbiano	Anaerobio			Anaerobio facultativo		Aerobio
E _h (mV)	-300 -200		-100 0 +100 +200 +300			+400 +500 +600 +700

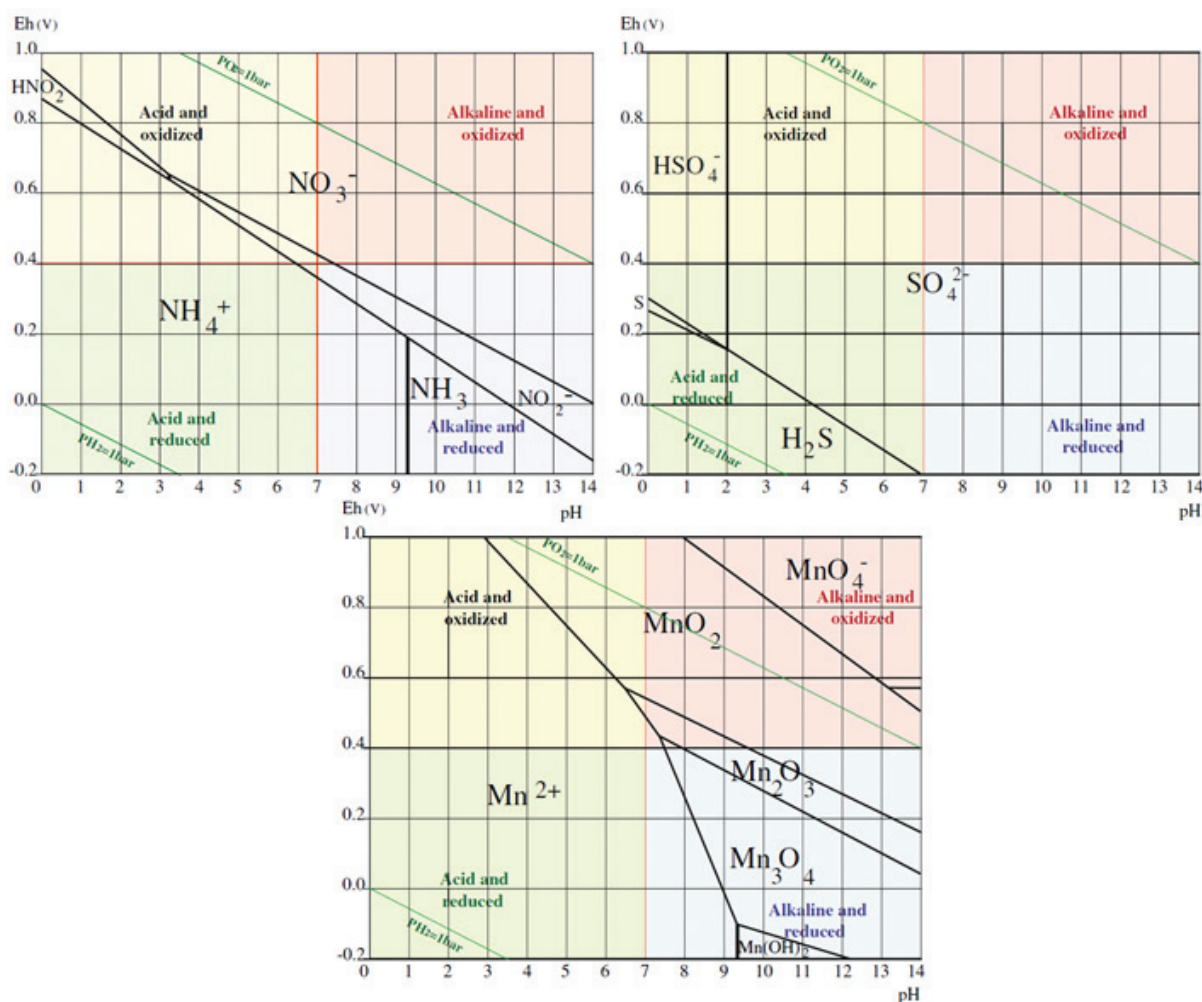


Figura 1.2. Diagramas de Pourbaix o diagramas de fase para las distintas formas de nitrógeno, azufre y manganeso en base al pH y Eh. Tomado de Husson (2013).

1. Introducción y objetivos

también se han asociado con el desarrollo de ciertos organismos fitopatógenos (Bailey & Beauchamp, 1971, Golterman, 1995, Husson, 2013).

Además, mediante la combinación de los valores de pH y Eh del suelo es posible predecir la fase en la que se encuentran los nutrientes y la disponibilidad tanto de éstos, como de los metales pesados (Seybold *et al.*, 2002, DeLaune & Reddy, 2005, Husson, 2013, Borin *et al.*, 2016). En condiciones óptimas de pH del suelo (7-8) y con una adecuada oxigenación (> +300 mV), el nitrógeno se encuentra en forma de NH_4^+ , el azufre en forma de SO_4^{2-} , el magnesio en forma de Mn^{2+} , el hierro en forma de $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$, el fósforo en forma de HPO_4^{2-} , etc. Este tipo de predicciones se pueden establecer gracias a los diagramas de Pourbaix (Figura 1.2).

Sin embargo, cada vez más autores coinciden en que un suelo sano no sólo se explica en términos físico-químicos, sino que la calidad del mismo también depende de su componente biológico. En suelo, la biodiversidad se refiere a la variedad de grupos taxonómicos en él existente, incluyendo procariotas, hongos, protozoos, nematodos, anélidos, platelmintos y artrópodos, que

componen una compleja red trófica (van Bruggen & Semenov, 2000), y que se sustenta gracias a la comunidad microbiana del suelo (Figura 1.3).

1.4. LA MICROBIOTA DE LOS SUELOS

El componente microbiano de un suelo sano, base de la resiliencia y del mantenimiento de las redes tróficas, se puede clasificar en dos tipos fundamentales. Uno corresponde al conjunto activo, funcionalmente redundante, que permite al suelo recuperarse cuando parte de la comunidad desaparece debido a una situación de estrés. El segundo, por el contrario, concierne a un conjunto quiescente de microorganismos, más rico en diversidad que el anterior, que responde a la incorporación de sustancias extrañas al suelo (Beare *et al.*, 1995).

En los suelos destinados a la agricultura, gestionados con un manejo convencional, es habitual encontrar una fertilización basada en nutrientes de síntesis y una aplicación continuada de plaguicidas, que normalmente son recalcitrantes y altamente tóxicos, a causa de las pérdidas que causan los hongos, nemátodos y moluscos en

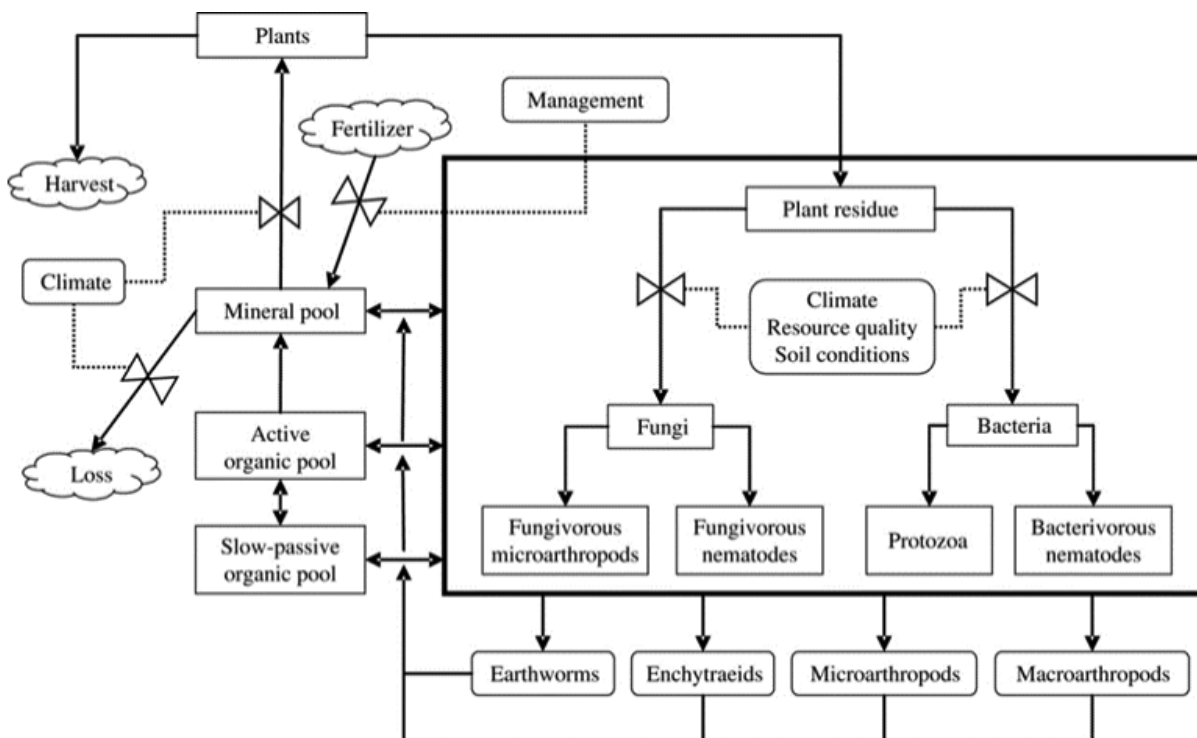


Figura 1.3. Relaciones tróficas entre las comunidades biológicas de un suelo destinado a agricultura. Los símbolos indican válvulas de compuerta. Tomado de Kibblewhite *et al.* (2008).

los monocultivos. Para demostrar hasta qué punto estas prácticas afectaban a los microorganismos del suelo, el equipo de Rüter *et al.* (1995) demostró que la estabilidad trófica era menor en los campos destinados a la agricultura convencional que en los suelos de ecosistemas naturales o sobre los que se aplican prácticas agrícolas integradas, debido a la pérdida de biodiversidad. Desde entonces se han llevado a cabo diversos estudios a largo plazo en campos fertilizados con insumos orgánicos en los que han encontrado claras diferencias en la composición poblacional microbiana con respecto a aquellos suelos mantenidos con fertilizantes sintéticos (Kramer *et al.*, 2006). Se observó, por ejemplo, que en el dominio *Bacteria* existía una correlación positiva entre el carbono total suministrado al suelo y la biomasa bacteriana del mismo y que se produce una inducción de la actividad de enzimas de oxidación de la materia orgánica como las proteasas, la L-asparaginasa y la β -glucosidasa, lo que contribuye al reciclado de nutrientes (Leita *et al.*, 1999, Marschner *et al.*, 2003, Kramer *et al.*, 2006, van Diepeningen *et al.*, 2006). En el dominio *Eukarya*, se encontró que la fertilización orgánica favorecía el crecimiento en biomasa de hongos de podredumbre blanca por el aporte de materia orgánica vegetal y de hongos arbusculares, debido a la presencia de sustancias promotoras del desarrollo, que con su presencia disminuyen el efecto de los hongos fitopatógenos (Fließbach & Mäder, 2000, Schjønning *et al.*, 2002, Gryndler *et al.*, 2003, Gryndler *et al.*, 2006, Mahdi *et al.*, 2010, Ngosong *et al.*, 2010).

En todos los agrosistemas, los nutrientes son necesarios para sustentar la producción, siendo los microorganismos los representantes del último eslabón de las cadenas tróficas, debido a que su diversidad específica y metabólica permite cerrar los ciclos de nutrientes y recircularlos a lo largo de las mismas. La cantidad de materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes y la dinámica de las especies microbianas son los factores que influyen en los cambios en el crecimiento de las plantas y en la composición de especies (Matsumoto *et al.*, 2005). Como resultado de la respiración aerobia y la fermentación, se obtiene una degradación enzimática, total o parcial, de la materia orgánica incorporada al sistema a través de los fijadores de carbono y nitrógeno, liberando al medio carbono de fácil asimilación y nutrientes en su forma más oxidada, que a su vez son reducidos gracias a los microorganismos respiradores anaerobios como los sulfato o sulfo-reductores, acetogénicos, metanogénicos, desnitrificantes, respiradores del hierro o deshalo-respiradores, lo que cierra el ciclo de nutrientes. Tal es la diversidad metabólica microbiana que constantemente se descubren nuevos proce-

sos que ayudan a comprender la complejidad de los ciclos biogeoquímicos, como la degradación de hidrocarburos o el proceso de oxidación anaerobia del amonio (anammox) (Madsen, 2011).

Cada nicho ecológico tiene su tipo de metabolismo, ya que el pH y el Eh determinan la disponibilidad de los nutrientes, y la humedad y la temperatura son determinantes para la actividad biológica (Muscolo *et al.*, 2007). En el caso particular de aquellos suelos destinados a la agricultura, en el horizonte A, la biomasa microbiana y su inherente actividad enzimática descienden a medida que lo hace el tamaño de la partícula de suelo, lo mismo que la abundancia del carbono de fácil asimilación (Kanazawa & Filip, 1986, Scharroba *et al.*, 2016), exceptuando a aquellas especies fúngicas que se han adaptado para degradar ciertos sustratos recalcitrantes, como diversos polifenoles (Heal & Dighton, 1986, Bollag *et al.*, 1988, Hättenschwiler & Vitousek, 2000, Scharroba *et al.*, 2016). Es necesario tener en cuenta que la actividad metabólica microbiana es altamente dependiente de la disponibilidad de carbono fijado, disponibilidad que en los sistemas agronómicos viene condicionada por el tipo de cultivo y material orgánico suplementado (Kibblewhite *et al.*, 2008), por lo que un suelo escaso en materia orgánica, presenta una actividad metabólica reducida. En el horizonte B, se encuentran retenidas las formas solubles tanto de nitrógeno como de fósforo procedentes del lixiviado, siendo normalmente los elementos limitantes en un entorno no antrópico (Tilman *et al.*, 2002, Borin *et al.*, 2016, Turner *et al.*, 2017). Otro elemento trascendental para la abundancia microbiana es el potasio, ya que requiere una especial recirculación dentro de las poblaciones microbianas y existe una gran competencia con las plantas por este nutriente comparado con otros elementos como el carbono o el nitrógeno (Nolte & Werner, 1994, Golterman, 1995). En la Tabla 1.2 se detallan las formas en las que se pueden encontrar los principales nutrientes en el suelo.

En general, la actividad global de todos los microorganismos produce una transformación periódica del suelo, produciendo un descenso del pH y el Eh (Husson, 2013) debido a la actividad enzimática. Los microorganismos disponen de un sistema de secreción de enzimas hidrolíticas para degradar la materia orgánica y facilitar la toma de nutrientes. Entre estas enzimas destacan la deshidrogenasa y los enzimas involucrados en los ciclos del carbono (β -glucosaminidasa), el nitrógeno (ureasa), el azufre (arilsulfatasa) y el fósforo (fosfatasa ácida y alcalina). Así, la actividad deshidrogenasa está relacionada con los procesos respiratorios microbianos (Bolton

Tabla 1.2. Principales formas inorgánicas de los nutrientes en suelos y sedimentos. Modificado de Patrick & DeLaune (1977).

Elemento	Forma oxidada	Propiedades	Forma reducida	Propiedades
C	CO ₂ , CO ₃ ²⁻ HCO ₃ ⁻	Gas ligeramente soluble	CH ₄	Gas relativamente insoluble
N	NO ₃	Muy soluble. No se adsorbe en el suelo	NH ₄ ⁺ NH ₃	Soluble pero se adsorbe a las partículas del suelo cuando tiene carga
P	PO ₄ ³⁻	Se adsorbe fuertemente en el suelo	H ₃ PO ₄	Insoluble si hay iones Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺
S	SO ₄ ²⁻	Relativamente soluble. Cierta fracción fijada en suelo	S ²⁻ HS H ₂ S	Insoluble si hay iones Fe ²⁺ o Mn ²⁺ . Soluble en agua
K	KOH K ₂ O	Muy soluble (Roca Madre)	K ⁺	Soluble a bajo pH
Mn	MnO ₂	Insoluble	Mn ²⁺	Ligeramente soluble, especialmente a bajo pH
Fe	Fe ₂ O ₃ (nH ₂ O) Fe(OH) ₃	Insoluble	Fe ²⁺	Ligeramente soluble, especialmente a bajo pH

et al., 1985), por lo que se considera una medida indirecta de los microorganismos viables (Gil-Sotres *et al.*, 2005) y un indicador de los procesos oxidativos del suelo (Trevors, 1984, Nannipieri *et al.*, 2002). Por otro lado, la β-glucosidasa es uno de los enzimas involucrados en la transformación/descomposición de la materia orgánica del suelo, siendo su producto final la glucosa; la principal fuente de carbono para los microorganismos del suelo (Deng & Tabatabai, 1994). Por su parte, la ureasa es un enzima clave en el ciclo del nitrógeno en el suelo y, cataliza la hidrólisis de la urea para dar dióxido de carbono y amoníaco (Gil-Sotres *et al.*, 2005, Riah *et al.*, 2014). La arilsulfatasa es un enzima muy generalizado en los suelos y se encuentra involucrado en el ciclo del azufre (Ganeshamurthy & Takkar, 1997). Finalmente, la actividad fosfatasa, tanto ácida como alcalina, es clave en el ciclo del fósforo y se considera un buen indicador de la fertilidad del suelo (Dick *et al.*, 2000). Mediante su actividad enzimática, los microorganismos no sólo contribuyen a la modificación del suelo, sino que producen compuestos extracelulares con propiedades adhesivas. Estos compuestos se producen como mecanismo de nutrición y como matriz que confiere unidad y protección a la colonia contra la desecación o como medio de unión a superficies (Kibblewhite *et al.*, 2008), lo que a su vez propicia la disminución de la erosión del suelo y permite una mayor conservación de la humedad.

Por todo ello, se considera un suelo sano a aquel sustrato que contenga materia orgánica que sustente una comunidad microbiana estable, que sea capaz de utilizar gran cantidad de rutas metabólicas para abastecer al sistema de todos los nutrientes que necesite para construir largas y robustas cadenas tróficas, y cuyo pH y Eh permita encontrarlos en forma biodisponible.

1.5. ESPECIES VEGETALES DE INTERÉS COMERCIAL

1.5.1. A nivel extensivo: Girasol (*Helianthus annuus* L.)

El girasol es uno de los cultivos de aceite más ampliamente cultivados en el mundo. Produce semillas ricas en aceite (45% del peso de la semilla, según Aguilar-García *et al.* (2005)) -que se emplea en la cocina, en la producción de margarina y en otros usos industriales- y en proteínas. Después de la extracción del aceite, se produce una pasta rica en grasas y proteínas útil para la alimentación animal (Escalante-Estrada, 1999).

En España, se sitúa en tercer lugar como cultivo herbáceo, por detrás de la cebada y el trigo, ocupando vastas extensiones de terreno en Andalucía (427.000 ha) y Castilla-La Mancha (335.000 ha), donde la producción es escasa debido a la prácticamente ausencia de regadío en estos cultivos (Gómez-Arnau, 1988). Se

trata de un cultivo de tipo extensivo porque puede abarcar hasta 60.000 plantas/ha en terrenos de secano y 90.000 plantas/ha en terrenos con regadío (Gómez-Arnau, 1988).

Su producción mundial se ve solamente superada por la soja y la colza (Flagella *et al.*, 2002), entre otras cosas, debido a escasa tolerancia a periodos de sequía (Hattendorf *et al.*, 1988), lo que impide que sea un cultivo apropiado en regiones subáridas o donde el riego sea limitado (Flagella *et al.*, 2002). Sin embargo, el girasol tiene un elevado punto de fotosaturación ($1.200 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) lo que le permite ser sembrado a bajas latitudes (Azcón-Bieto *et al.*, 2004). Por otra parte, se trata de una planta que transpira de forma abundante tanto en temporadas de abundancia como escasez de agua, aunque, en condiciones de estrés hídrico, reduce de forma eficiente la apertura de los estomas, disminuyendo la transpiración, pero no la difusión del CO_2 hacia el cloroplasto, lo que hace que aumente la eficiencia en el uso del agua (EUA) en un 20-50% y que presente un mayor rendimiento en condiciones de sequía que otras especies vegetales y una rápida recuperación tras riego o lluvia (Gómez-Arnau, 1988).

La germinación de la pipa comienza inmediatamente después de su hidratación a temperaturas suaves del suelo ($15\text{-}20^\circ\text{C}$), iniciándose la degradación de macro-

moléculas de reserva que resultan en un aumento de sustancias de mayor actividad osmótica (por ejemplo, hidratos de carbono de bajo peso molecular) (Aguirrezábal *et al.*, 2001). La longitud del ciclo del girasol depende fundamentalmente de la temperatura y del fotoperiodo, durando entre 120 y 160 días el periodo comprendido entre siembra y recolección (Gómez-Arnau, 1988).

Su potente entramado radical hace que las plantas sean capaces de extraer grandes cantidades de nutrientes de la tierra, agotando en muchos casos suelos bien fertilizados. Algunos estudios han probado que el girasol obtiene el 70% del nitrógeno del que ya había disponible en el suelo procedente de abonados anteriores y un 30% del abono de ese mismo año de cultivo, por lo que un buen planteamiento de las especies a sembrar, teniendo en cuenta las capas del suelo que sus raíces son capaces de alcanzar, se vuelve crucial para un óptimo aprovechamiento de los fertilizantes (Gómez-Arnau, 1988).

1.5.2. A nivel intensivo bajo plástico: Pimiento (*Capsicum annum* L.)

El término horticultura incluye el cultivo de flores, frutas y verduras. Desde los años 60 se está incrementando la producción de este tipo de cultivos, y como recogen Weinberger & Lumpkin (2007) son los países

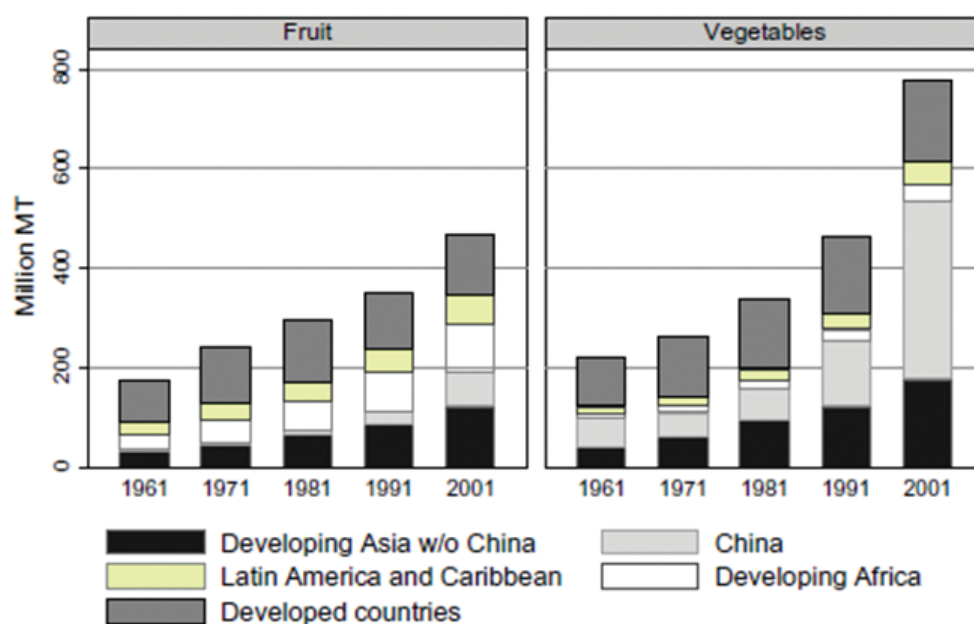


Figura 1.4. Producción global de frutas y verduras. Tomado de Weinberger & Lumpkin (2007).

asiáticos, fundamentalmente China e India y los países considerados desarrollados los que generan mayor producción (Figura 1.4).

Una de estas especies es el pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.), planta hortícola de la familia de las solanáceas que se produce durante todo el año en invernadero (Rylski & Spigelman, 1982, Bakker, 1989, Lycoskoufis *et al.*, 2005) y uno de los cultivos más importantes del mundo por la multitud de usos gastronómicos (Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno, 1990). En la Península Ibérica, una de las regiones de mayor producción de planta hortícola se localiza en la provincia de Almería, que desde 1962 dedica miles de hectáreas (36.750 ha) a la producción en invernadero (Aznar-Sánchez *et al.*, 2011). Este tipo de producción resulta muy efectiva, ya que crea microclimas en los que la temperatura diurna aumenta, lo cual es beneficioso en invierno, y se previene a las plantas de las caídas nocturnas de temperatura, además de proteger al cultivo de la acción del viento y la lluvia. Normalmente, el método de irrigación es por goteo, ahorrando agua y fertilizante y evitando a su vez daños foliares, problemas de salinidad -el pimiento no se considera halotolerante (Maas & Hoffman, 1977, Navarro *et al.*, 2002)- por decaimiento de la tasa fotosintética cuando se ve expuesto a altas concentraciones salinas (De Pascale *et al.*, 2003) y reduciendo el número de malas hierbas (Tout, 1990).

También se ha convertido en un vegetal de importancia en la nutrición humana, debido a su contenido en moléculas antioxidantes (Conforti *et al.*, 2007). Las diferentes variedades de pimiento disponibles para consumo humano son una gran fuente de carotenoides (Conforti *et al.*, 2007), que se emplean como oleorresinas o colorantes y saborizantes naturales (Minguez-Mosquera & Hornero-Mendez, 1993, Kothari *et al.*, 2010), vitaminas C, E (Daood *et al.*, 1996, Palevitch & Craker, 1996, Conforti *et al.*, 2007) ácido fólico y tiamina (Kothari *et al.*, 2010), carotenoides (Krinsky, 1994, Matsufuji *et al.*, 1998, Krinsky, 2001), minerales como molibdeno, manganeso, potasio y capsinoides, alcaloides con propiedades farmacológicas que otorgan el sabor típico al pimiento (Daood *et al.*, 1996, Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001, Ravishankar *et al.*, 2003). Además, algunas de las variedades tienen gran concentración de provitamina A (²-caroteno y ²-criptoxantina) (Minguez-Mosquera & Hornero-Mendez, 1993) y flavonoides y fenoles, cuya actividad antioxidante se basa en las propiedades oxidorreductoras de sus grupos hidroxilo (Rice-Evans *et al.*, 1996, Rice-Evans *et al.*, 1997, Burda & Oleszek, 2001). Además, diversos estu-

dios epidemiológicos mostraron una relación entre la aparición de ciertos cánceres y la ausencia de ciertos carotenoides en la dieta (Shekelle *et al.*, 1981, Moon & Itri, 1984).

1.5.2.1. La importancia de los nutrientes

Las plantas pueden tomar nitrógeno tanto en forma amoniacal, como nítrica. Esta última forma es normalmente preferencial para el crecimiento de los cultivos, aunque depende de la especie vegetal y de las condiciones ambientales. La toma de nitrógeno amoniacal puede ser tóxica para el crecimiento vegetal, cuando el suelo es alcalino y se encuentra en alta concentración. Los cultivos intoxicados presentan un crecimiento irregular de las hojas, tallo, una menor síntesis de almidón, una acumulación de aminoácidos y una disminución de la toma de agua y exudación de compuestos por parte de la raíz. Además, la actividad Nitrato Reductasa disminuye con grandes cantidades de esta forma nitrogenada y se encuentran presentes inhibidores de la nitrificación (Slangen & Kerkhoff, 1984). Los diferentes estudios realizados sobre la eficiencia de la aplicación bien de amonio, que en suelos aerobios y a una temperatura óptima se ve sometido a los procesos de nitrificación, o nitrato en varios cultivos tanto extensivos como hortícolas han mostrado que el rendimiento que obtiene un cultivo oscila entre el 21 y el 79% (Slangen & Kerkhoff, 1984).

La toma de nitrato por las plantas suele estar acoplada a una excreción de bicarbonato o grupos hidroxilo y la toma de amonio, a protones, de modo que la rizosfera se vuelve más alcalina o ácida según el tipo de nutrición (Slangen & Kerkhoff, 1984). Además, las diferencias en pH afectan a la actividad de los microorganismos del suelo, condicionan su presencia y el lixiviado de ciertos elementos como el calcio, magnesio y potasio.

El exceso de fertilización nitrogenada que se da en el manejo convencional tras el trasplante a campo conduce al crecimiento de malas hierbas, contra las que el cultivo de pimiento no resulta buen competidor debido a su reducida tasa de crecimiento, llegando a reducirse la producción hasta un 44% (Isik *et al.*, 2009). En los últimos años ha surgido controversia acerca de usar plaguicidas para evitar esta situación, dado que afectan también a organismos que no son diana del compuesto, el remanente que puede quedar en los alimentos comercializados, la contaminación de acuíferos, la selección de individuos resistentes y la toxicidad sobre mamíferos (Schroeder *et al.*, 1993, Kropff & Wal-

ter, 2000), por ello, encontrar un balance de nitrógeno óptimo y desarrollar nuevos protocolos de manejo de los cultivos se vuelve cada vez más necesario (Stefaneli *et al.*, 2010).

1.5.3. A nivel forestal: pino insigne, pino de monterrey (*Pinus radiata* D. Don)

Pinus radiata, también conocido como pino insigne o pino de Monterrey, es una especie originaria de la zona suroeste de América del norte y Méjico, que ha sido introducida de forma exitosa en países como Australia, Chile, España, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Raison & Myers, 1992, Schweigkofler *et al.*, 2004). Entre sus cualidades, destaca su adaptabilidad, con un rango amplio de temperatura para su crecimiento (5 a 20°C) y un valor óptimo de 12°C (Romanyà & Vallejo, 2004), su elevada producción (>14 m³/ha) (Romanyà & Vallejo, 2004) y un periodo de rotación corto (25-35 años) (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2002, Merino *et al.*, 2004); cualidades que lo han convertido en un elemento muy valioso para el sector primario.

El pino insigne representa la conífera alóctona más importante en España, ocupando un total de 270.000 ha que se distribuyen por Asturias, Cantabria, Castilla y León y Galicia, aunque las zonas más productivas se encuentran en la vertiente cantábrica, donde ocupa el 55% de su superficie arbolada (Eustat, 1996, Zas & Serrada, 2003). Esta especie proporciona una gran rentabilidad, pudiéndose destinar a diferentes usos, entre los que destaca la fabricación de pasta de papel y la elaboración de vigas, tableros, e incluso muebles. Además, posee un valor añadido basado en el importante papel que desempeñan como sumideros de carbono, reconociendo a la actividad forestal un valioso papel de mitigación ante el cambio climático. Como aspecto negativo hay que mencionar que las grandes densidades de esta especie en las plantaciones, propiciada principalmente por la práctica del monocultivo, ha derivado en casos de déficit nutricional del suelo, así como problemas causados por ataques de insectos y hongos fitopatógenos.

La repoblación artificial es el método de regeneración de los montes con esta especie, utilizándose para ello planta de una savia producida en viveros de la zona. En las últimas décadas se ha producido una transformación gradual en los sistemas de producción de planta de pino insigne, pasando en poco tiempo de la producción a raíz desnuda al cultivo en contenedor, ya que este sistema de cultivo permite una producción más rápida, extender la época de plantación y reducir la crisis posterior al trasplante.

La supervivencia y el desarrollo en campo de las plantas forestales producidas en vivero dependen de la capacidad de su sistema radical para emitir raíces y establecer contacto rápidamente con el suelo que lo rodea, así como de su habilidad para tolerar diversos factores ambientales de estrés (Burdett, 1990). Es por ello que el éxito de todo programa de reforestación depende principalmente de la calidad de la planta a la salida del vivero, calidad que está determinada por caracteres genéticos, fisiológicos y morfológicos que interactúan conjuntamente con el medio ambiente (Ruano, 2003) y que, en gran medida, están influenciados por el manejo llevado a cabo durante su producción (Landis, 1990). Entre las variables fisiológicas más influenciadas destacan el potencial hídrico, la fotosíntesis neta, el contenido nutricional y la capacidad de emisión de nuevas raíces. En el caso de los atributos morfológicos, la altura, el diámetro a nivel de cuello de raíz, el peso seco (raíz-tallo-acículas), la presencia de yema terminal y el estado sanitario (Prieto *et al.*, 2009). Así, la utilización de índices basados en variables biométricas va a ser determinante a la hora de evaluar la calidad de la planta.

- * Índice de robustez: la relación entre la altura (cm) y el diámetro (mm). Es un indicador de la resistencia a la desecación por el viento, de la supervivencia y del crecimiento potencial en sitios de baja disponibilidad hídrica. Se ha estimado que un índice inferior a 6 es indicativo de buena calidad de la planta, que posee un equilibrio entre las partes hipogea-epigea.
- * Relación altura de tallo/longitud de la raíz principal, que si está equilibrada augura el éxito de la plantación. Se ha observado que la relación 1:1 favorece altas tasas de supervivencia en sitios de plantación sin limitaciones ambientales; mientras que relaciones 0,5:1 son adecuadas para sitios con humedad limitada.
- * Relación peso seco de la parte aérea/peso seco del sistema radical. Se ha evaluado que una buena relación debe fluctuar entre 1,5 y 2,5, ya que valores mayores indican descompensación y la existencia de un sistema radical insuficiente para proveer de energía a la parte aérea de la planta (Thompson, 1985).
- * Índice de calidad de Dickson (ICD). Este índice expresa el equilibrio en la distribución de la masa y la robustez. Es el índice más completo, lo que facilita a la hora de repoblar, el descarte de plantas desproporcionadas y la selección de ejemplares de menor altura, pero con mayor vigor.

Durante la fase de vivero, la fertilización es, junto con el manejo de riego, una de las variables culturales con mayor influencia en la calidad de la planta, especialmente si el proceso de producción se realiza en régimen intensivo y en cortos intervalos de tiempo. La fertilización interviene en todos los atributos de calidad tenidos en cuenta en la caracterización de la planta forestal, influyendo en la respuesta de éstas después de su trasplante a campo (Van den Driessche, 1991a); en especial, puede acelerar o retrasar el crecimiento de la planta, tanto de su parte aérea como radical, y puede alterar la composición nutritiva de los tejidos, con efectos sobre el nivel de reservas, la capacidad de arraigo, la resistencia a estrés hídrico y al frío, así como a enfermedades (Oliet *et al.*, 1999), una vez que la planta haya sido introducida en campo. Además, una nutrición balanceada es la clave para proporcionar un equilibrio entre crecimiento y resistencia a las enfermedades (Lambert, 1986).

El manejo convencional de la producción de pino insignie en la CAPV se basa en la fertilización mineral, aplicada como abono de liberación lenta; esta aplicación de NPK busca potenciar un crecimiento vigoroso que reduzca el estrés y mejore la salud general del árbol (Blodgett *et al.*, 2005). En este sentido, varios trabajos constatan el efecto favorable de un incremento en el aporte y la concentración de nitrógeno en la actividad fotosintética (Hawkins *et al.*, 1995) y, en consecuencia, en la extensión de nuevas raíces (van den Driessche, 1992), lo que, tras el trasplante a campo, incrementaría su adaptación a las nuevas condiciones y su posterior crecimiento. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el aporte de nitrógeno puede tener efectos desfavorables al causar desequilibrios morfológicos debido a un mayor desarrollo aéreo (Landis *et al.*, 1989, van den Driessche, 1992), lo que afecta negativamente a su capacidad de tolerar el déficit hídrico post-trasplante; además, al favorecer la formación de tejidos más suculentos (Landis *et al.*, 1989), conduce a una gran susceptibilidad a la infección por patógenos (Lambert, 1986, Snoeijers *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado que la relación entre la adición de azufre y nitrógeno es uno de los factores más críticos que afectan a la salud vegetal, debiendo ser el aporte de azufre, además, similar al del fósforo.

1.5.3.1. *Fusarium circinatum*, agente causante del chancro resinoso de los pinos

En 1946 se detectó, en el sureste de los Estados Unidos, la existencia de un hongo patógeno de varias especies

de pino que décadas después había conseguido trasladarse hacia masas boscosas de *P. radiata* en California (Britz *et al.*, 2001, Gordon, 2006). Se trata del hongo ascomiceto fitopatógeno *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (1998) anamorfo del hongo *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell ex Britz, T.A. Cont., M.J. Wingf. & Marasas (2002) y causante de la enfermedad del chancro resinoso de los pinos (Pitch canker). Esta enfermedad afecta principalmente a las coníferas del género *Pinus*, habiéndose detectado hasta el momento en más de 40 especies (Viljoen *et al.*, 1994), y de las que *P. radiata* es la más susceptible a la infección por su reducida diversidad genética y las vastas plantaciones donde se produce en monocultivo (Schweigkofler *et al.*, 2004). Como consecuencia de la exportación maderera entre continentes, y manteniéndose en dormancia en las semillas o en madera de árboles asintomáticos, el patógeno ha conseguido traspasar la barrera oceánica, extendiéndose a viveros y plantaciones de Australia, Chile, Colombia, España, Italia, Japón, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Britz *et al.*, 2001, Wingfield *et al.*, 2002, Schweigkofler *et al.*, 2004, Wingfield *et al.*, 2008, Steenkamp *et al.*, 2012). Las prácticas convencionales de control de enfermedades no son efectivas (Reglinski *et al.*, 2004) para esta especie, lo que hace que en la UE esté considerado un organismo de cuarentena.

Normalmente, los patógenos autóctonos causan daños reducidos en las masas arbóreas debido a una selección labrada durante mucho tiempo por las interacciones entre parásito y huésped, dado que se suelen ver favorecidos genotipos de resistencia en las plantas a lo largo de generaciones. Sin embargo, esta compensación se rompe en el momento en el que se introduce un patógeno alóctono, que se aprovecha precisamente de una ausencia de resistencia del huésped que de darse el caso, ocurre a tan baja frecuencia que para solventar el problema tendría que verse seleccionado el genotipo resistente de forma natural o mediada por el hombre (Aegerter & Gordon, 2006). Esto es precisamente lo que ha ocurrido con *F. circinatum* y *P. radiata* (Gordon *et al.*, 2011).

Por ello, la enfermedad de Pitch canker o chancro resinoso es considerada la mayor amenaza que sufren las plantas de género *Pinus* en la actualidad. Los tejidos parenquimáticos de las plántulas facilitan la penetración de estos hongos (Lewis, 1973), ya que éstos disponen de estructuras invasivas (Martín-Rodríguez *et al.*, 2015), que penetran en las células, causando su muerte (Kacprzak *et al.*, 2001). Sin embargo, *F. circinatum* es capaz de causar daños en cualquier momento del ciclo

vital del pino: plántula, floración, semilla o árbol maduro (Pérez-Sierra *et al.*, 2007, Wingfield *et al.*, 2008). Sus síntomas más característicos son, en el caso de árboles maduros, la formación de grandes chancros en el tronco con abundante exudación de resina, el marchitamiento de las acículas cercanas al punto de inoculación debido a la obstrucción del flujo hídrico, que se extiende de forma simultánea a la ascensión del patógeno y conduce a una eventual desecación de la parte superior del árbol, lo que impide su crecimiento (Morse *et al.*, 2004, Schweigkofler *et al.*, 2004, Carey *et al.*, 2005, Wingfield *et al.*, 2008). En el caso de planta joven, crecida en vivero, produce decaimiento y desecación de las acículas, desecación del tallo y, por último, la muerte de la planta. No obstante, *F. circinatum* puede estar presente de forma asintomática, con el peligro que esto conlleva en relación con la expansión de la enfermedad. En el caso de la semilla, causa un deterioro visible y reduce de forma significativa la emergencia de ésta, sin embargo, en ocasiones no presentan alteraciones y al germinar producen plántulas sintomáticas (Wingfield *et al.*, 2008).

Esta enfermedad del chancro es de las más graves que pueden sufrir las coníferas a nivel mundial, debido a su rápida progresión y propagación, a que provocan un descenso en el rendimiento en la producción de madera y a los altos niveles de mortalidad que genera tanto en plántulas como en árboles adultos (O'Donnell *et al.*, 1998). En España se ha detectado en *Pinus pinaster*, *P.*

radiata y *P. sylvestris*, tanto en vivero, como en plantaciones forestales (Landeras *et al.*, 2005), lo que ha causado una gran alarma ya que su presencia acarrea graves repercusiones negativas tanto a nivel económico, como ecológico y de gran impacto social (Wingfield *et al.*, 2001).

Tradicionalmente, este patógeno ha sido considerado como un “air-borne”, es decir, que infecta a la parte aérea de la planta, precisando de un portal de entrada a través de heridas mecánicas (asociadas a la climatología o a prácticas silvícolas) u orificios de alimentación causados por insectos perforadores (Franceschi *et al.*, 2005). El proceso de entrada a través de la herida consiste en colonizar el tejido con más nutrientes del tallo, el floema, que se distribuye a modo de anillo periférico al xilema, y la consiguiente propagación a través de los conductos de resina y el tejido xilemático para realizar movimientos verticales y de los radios medulares para colonizar la médula (Figura 1.5), donde se produce la esporulación del hongo (Martín-Rodríguez *et al.*, 2013).

Sin embargo, recientemente se ha demostrado que este patógeno es capaz de comportarse como un patógeno de suelo o “soil-borne” e infectar a las plantas tras penetrar por sus raíces (Sanchez-Zabala *et al.*, 2013, Martín-Rodríguez *et al.*, 2015), aprovechando la formación de nuevas ramificaciones de las raíces secundarias. Esta constatación tiene importantes implicaciones en relación al manejo y control de este patógeno en los

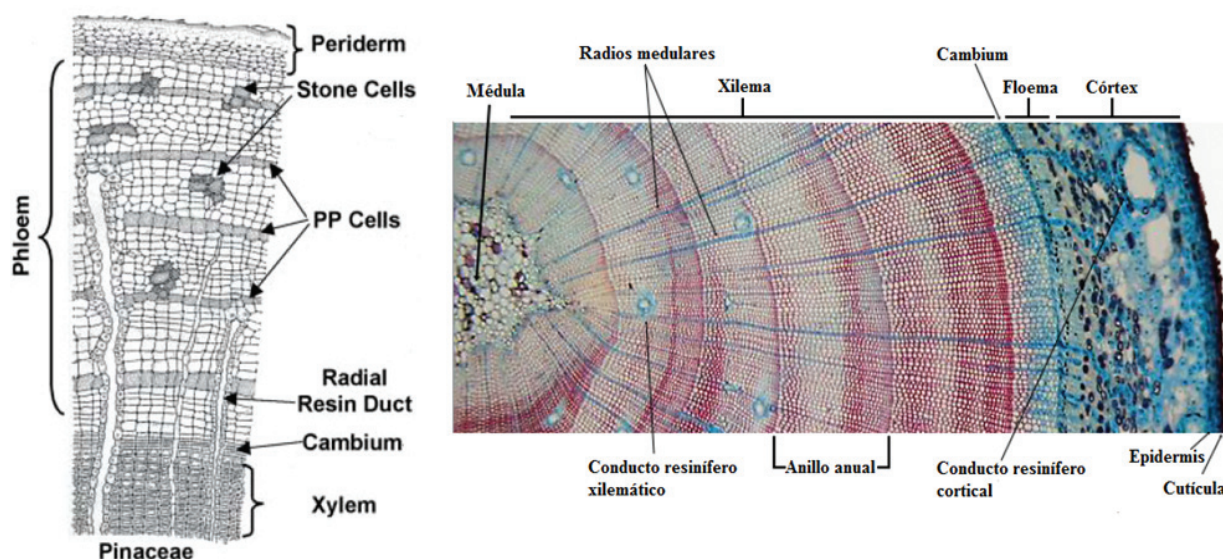


Figura 1.5. Secciones transversales de un tallo del género *Pinus*. En la zona del floema se distinguen distribuidas en hilera las células fenólicas del parénquima (PP cells). Modificado de Franceschi *et al.* (2005) y Koning (1994).

viveros forestales (Fraedrich & Miller, 1995), en los que la responsabilidad es máxima por la posición que ocupan en la cadena de la producción forestal. Se ha demostrado que las esporas de *F. circinatum* son capaces de sobrevivir durante 6 meses en suelo húmedo, hasta un año en suelo seco y más de tres años en suelos refrigerados (Wingfield *et al.*, 2008) pese a no tener clamidosporas, por lo que reutilizar el sustrato en los viveros que presentan plantas contaminadas sería una práctica a evitar.

1.5.3.2. Protocolo de actuación en vivero

Las prácticas utilizadas para el control de la enfermedad en vivero se han limitado a la detección temprana de síntomas de la enfermedad, seguido de la destrucción de las plántulas afectadas, así como, en algunos casos, a la esterilización de los contenedores y las semillas. La literatura contempla algunas prácticas erróneas en el manejo en vivero, como por ejemplo la manipulación en la fase de trasplante, que puede generar heridas en el entramado radicular debido a la manipulación; o el encharcamiento de la turba producido por un mal drenaje, que afecta al pH y repercute en la vigorosidad del pino más que al crecimiento del patógeno (Kacprzak *et al.*, 2001). De no mantener ciertas precauciones, estos procedimientos predisponen a las plántulas a la infección por patógenos de suelo.

En países como Chile se monitoriza la población patógena en los sustratos de vivero y se establecen protocolos de detección de plántulas infectadas asintomáticas (González, 2005, Rotella, 2005). Se han probado también algunos fungicidas, pero no existen datos concluyentes que demuestren su efectividad contra este organismo plaga (Moraga-Suazo *et al.*, 2011). En la actualidad, cada vez cobra más auge el desarrollo de procedimientos de control integrados, respetuosos con el medioambiente, y en los que se testan diferentes microorganismos como posibles agentes de biocontrol (LeTacon & Bouchard, 1986, Pedersen *et al.*, 1999, Mandeel, 2006), ámbito que no se ha explorado lo suficiente, principalmente debido a que no se consideraba a *F. circinatum* un patógeno de suelo. Sin embargo, las evidencias indican un cambio en la forma de ver el manejo de este patógeno, habiéndose publicado recientemente el primer estudio sobre biocontrol, en el que se evalúa la efectividad de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. como agentes de control de este patógeno (Moraga-Suazo *et al.*, 2011).

Por otra parte, una gestión integrada que asegure la buena salud de un sistema forestal debe ser constante

en cuanto a prevención y control. Es en este punto donde cobra importancia una adecuada selección de la planta a cultivar, siendo la plantación de las estirpes genéticamente más resistentes una de las principales actuaciones para el control de la enfermedad. Los resultados obtenidos por Roux y colaboradores (2007) confirman la existencia de diferencias en la susceptibilidad de *Pinus* spp. tanto a nivel de especie como de híbrido, e incluso a nivel de clon. Estos hechos plantean la conveniencia de combinar, en los programas de mejora genética, las propiedades deseables de la madera con la tolerancia al patógeno. Sin embargo, habría que tener en cuenta que la selección por resistencia al patógeno es viable a largo plazo, pero no puede proporcionar protección a aquellos árboles que permanecen creciendo en vivero, por lo que la aplicación de elicitors en esta fase (jasmónico, salicílico y ciertas macromoléculas como algunos carbohidratos, lípidos, proteínas y glicoproteínas) y oligosacáridos procedentes de células fúngicas (glucano, quitina y quitosano) se podría considerar un método eficaz para la estimulación de las defensas de estas plantas (Reglinski *et al.*, 2004).

Por todo lo mencionado, resulta importante revisar los protocolos de actuación a la hora de almacenar y comercializar semillas y troncos de *P. radiata*, elaborar pautas de detección eficaz de plantas asintomáticas en vivero para evitar su trasplante a campo, así como encontrar una solución al problema de cuarentena de los viveros, para así impedir que se esquilme la producción. Lo ideal sería una gestión medioambientalmente sostenible, carente de plaguicidas y de exceso de nutrientes que desaprovechen las plantas y favorezcan a las plagas.

1.5.3.3. Mecanismos de defensa de las plantas frente a la infección por patógeno

Existen múltiples mecanismos de detección, señalización y respuesta frente a una interacción con microorganismos. Ente las respuestas de las plantas destacan los siguientes mecanismos de defensa: síntesis y secreción de sideróforos de Hierro, Potasio, Fósforo, que prevengan su asimilación por parte de los patógenos durante la colonización; producción de potentes antifúngicos de amplio espectro como PCA (ácido fenazin-1-carboxílico) o DAPG (2,4-diacetilfloroglucinol); enzimas hidrolíticas como proteasas; síntesis y secreción de hormonas: auxinas para la división celular; etileno, como respuesta frente a estrés; la ACC deaminasa, que en detrimento de la anterior, emplea el ACC o 1-aminociclopropano-1-carboxílico (precursor

del etileno) como fuente de nitrógeno, lo que inhibe la síntesis de etileno asociado con la senescencia para aprovechar nutrientes durante la infección; inducción de la síntesis de ácido salicílico y jasmónico, etc. Destaca también la gran variedad de metabolitos secundarios acumulados como defensa constitutiva: resinas, terpenos y fenoles, tanto en el interior como en el córtex, de demostrada resistencia contra los enemigos naturales por su efectividad como moléculas fungicidas y antioxidantes (Barry *et al.*, 2001, Witzell & Martín, 2008, Fossdal *et al.*, 2011). Incluso algunos de ellos podrían contribuir indirectamente a la resistencia al funcionar como precursores de otros compuestos destinados a la defensa.

Muchos flavonoides suelen acumularse en la zona donde se produce el contacto con el patógeno y pueden ser inducidos sistemáticamente en las acículas. De hecho, la inducción de la síntesis de compuestos fenólicos puede ocurrir de forma local, en zonas cercanas a la zona de infección y de forma sistémica, en zonas lejanas a la infección (Witzell & Martín, 2008). Además, otras estrategias de protección son la oclusión de los elementos del xilema con compuestos insolubles para evitar la propagación (Yamada *et al.*, 2003) y la presencia de células polifenólicas del parénquima o PP cells (Nagy *et al.*, 2004).

La activación del metabolismo tras el contacto con un fitopatógeno y posterior acumulación de ciertos compuestos responde a dos tipos principales de respuesta: La Resistencia Sistémica Inducida o RSI (Bonello *et al.*, 2006) y la Resistencia Sistémica Adquirida o RSA. La RSI suele ser desencadenada por bacterias promotoras del crecimiento o por microorganismos del suelo, pero no causa una acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, ni ácido salicílico; sino que se utilizan las vías reguladas por el ácido jasmónico y el etileno, que inducen otros genes distintos a la RSA (Morse *et al.*, 2004, Vallad & Goodman, 2004, Camarena-Gutiérrez & de la Torre-Almaráz, 2007). Por otra parte, la RSA confiere resistencia al patógeno que la ha activado, pero también a otros patógenos y a largo plazo. Esta activación va acompañada de un incremento endógeno, local y posteriormente sistémico de ácido salicílico, que a su vez activa una serie de proteínas reguladoras y factores de transcripción que regulan la expresión de genes de defensa que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (Pathogenesis Related Proteins o PR proteins), siendo los productos finales de las vías de transducción de la respuesta a patógeno (Bonello *et al.*, 2001) (Figura 1.6).

Durante la interacción planta-patógeno son varias familias de genes las que pueden sufrir una sobre- o su-

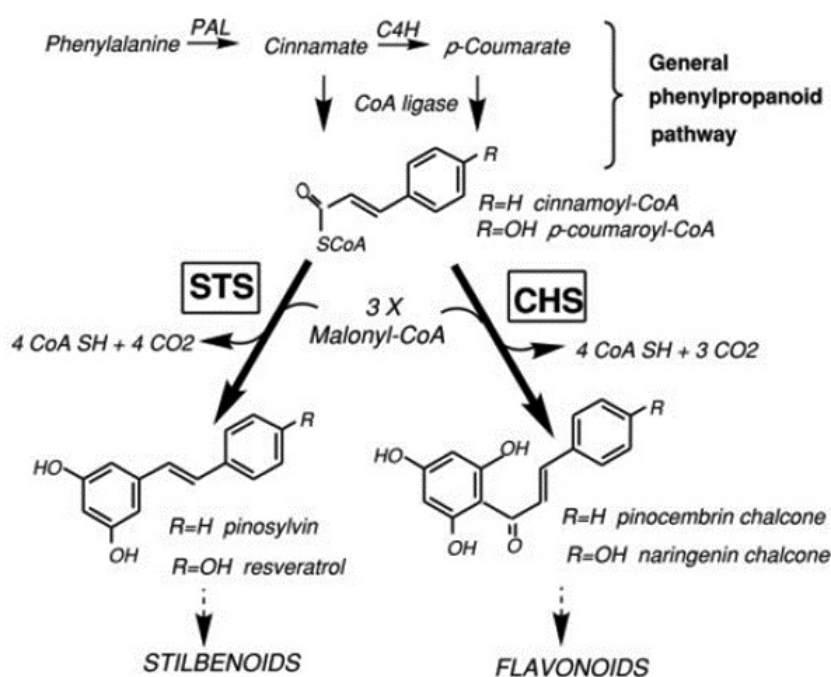


Figura 1.6. Ruta de síntesis para los estilbenos y los flavonoides. STS: Estilbeno Sintasa, CHS: Chalcona Sintasa, PAL: Fenilalanina Amonio Liasa, C4H: Cinamato-4-hidroxilasa. Tomado de Kodan *et al.* (2002).

bexpresión. Los principales genes estarían relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana como los compuestos fenólicos (Bollag *et al.*, 1988, Mayer, 2006, Zabka & Pavela, 2013), la formación de estructuras lignificadas que sirven de barrera física frente a la penetración (Bonello *et al.*, 2003), enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos (Veluthakkal & Dasgupta, 2010) y proteínas PR (Pathogenesis Related) tales como la Chalcona Sintasa, responsable del inicio de la ruta de biosíntesis de los flavonoides y fitoalexinas (Richard *et al.*, 2000, Yu & Jez, 2008, Donoso *et al.*, 2015); la Fenilalanina Amonio Liasa, responsable del inicio de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides (Van Etten *et al.*, 1994, Butland *et al.*, 1998); la familia PR-3 o Quitinasas, responsables de la degradación de la quitina fúngica (Davis *et al.*, 2002) y la familia PR-2 o Glucanasas, responsables de degradar el β -1,3-glucano de la pared fúngica (Dong & Dunstan, 1997, Wei *et al.*, 2005) que se relacionan con la resistencia sistémica adquirida (Hutcherson, 1998).

Un requerimiento esencial para la resistencia sistémica adquirida es que la infección cause una lesión necrótica. La reacción comienza localmente, en las células adyacentes a la respuesta hipersensitiva, donde se observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina y la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Camarena-Gutiérrez & de la Torre-Almaráz, 2007).

1.6. FERTILIZACIÓN CONVENCIONAL VS. FERTILIZACIÓN ORGÁNICA: UN ACERCAMIENTO HACIA LA SOSTENIBILIDAD

El modelo de “altos insumos” de la agricultura convencional, basado en la aplicación constante, preventiva y frecuente de productos de síntesis química, ha llevado a que la necesidad de mantener un buen nivel de materia orgánica en los suelos agrícolas sea infravalorada, olvidando que el suelo no es un simple soporte para el crecimiento de las plantas y que su contenido en materia orgánica desempeña un papel clave en el mantenimiento de sus propiedades, su estructura y su capacidad productiva. Pero, además, los problemas que arrastra la gestión tradicional de los cultivos abarcan desde la degradación del suelo, pasando por la contaminación de los cursos fluviales, hasta las contribuciones al cambio climático global y la simplificación de los paisajes. Todos los fertilizantes nitrogenados (exceptuando los que contienen como elemento nitrogenado nitrato de calcio o de sodio) causan acidi-

ficación del suelo y aquellos con base de nitrato o amoniacal reducen la biodiversidad del suelo. Por otro lado, aunque la aplicación continuada de nitrógeno inorgánico se traduce en un pequeño incremento de materia orgánica en el suelo, éste es insignificante comparado con el uso a largo plazo de abonos orgánicos (Jenkinson, 2001).

Como contraposición a este modelo convencional de fertilización, existen fertilizantes de tipo orgánico, procedentes del reciclado de distintos restos vegetales o animales, ricos en materia orgánica, que a menudo se ofertan como complemento a -o sustitutivo de- la fertilización y aportan múltiples beneficios. Entre todos ellos, que aparecen resumidos en la Tabla 1.3., cabe destacar el incremento de la materia orgánica en el suelo, lo que mejora su estructura, así como la estabilidad de los agregados del suelo y la percolación, por lo que se incrementa su capacidad de retención de agua (Stoate *et al.*, 2001, Mäder *et al.*, 2002, Birkhofer *et al.*, 2008, Gomiero *et al.*, 2011). Además, exige un arado menos frecuente y complementado con la rotación de cultivos, se obstaculiza la erosión del suelo al tener cobertura vegetal durante todo el año y se promueve el crecimiento de la microbiota edáfica natural, reduciendo la susceptibilidad de los cultivos a plagas y consecuentemente el nivel de uso de pesticidas (Stoate *et al.*, 2001, van Diepeningen *et al.*, 2006, Birkhofer *et al.*, 2008, Gomiero *et al.*, 2011). Otro de los importantes beneficios es que requieren menor energía para su síntesis y su aplicación ofrece mucha energía al sistema, lo que permite preservar la abundancia y biodiversidad de animales, plantas y microorganismos (Mäder *et al.*, 2002, Bengtsson *et al.*, 2005, van Diepeningen *et al.*, 2006, Birkhofer *et al.*, 2008, Gomiero *et al.*, 2011, van Trump *et al.*, 2011, Puglisi *et al.*, 2013). Finalmente, hay que destacar que se trata de una aplicación con efectos más beneficiosos para el medio ambiente ya que estos insumos orgánicos presentan menos niveles de nitrato y nitrógeno total soluble- sin variar los niveles de nitrógeno orgánico, fosfatos y fósforo total- con respecto a otras prácticas, lo que redundaría en una mejora de la eficiencia en el uso del nitrógeno (Keeling *et al.*, 2003, van Diepeningen *et al.*, 2006, Dawson *et al.*, 2008), y, además, debido a su capacidad de almacenar CO₂ en el suelo, podrían ser una estrategia para la mitigación de este gas si se aplicara a largo plazo (Gomiero *et al.*, 2011).

Aunque algunos fertilizantes de tipo orgánico, como los procedentes de lodos de depuradora, incrementan las emisiones de N₂O y NO; otros, como los procedentes de residuos de plantas compostadas o estiércol de aves de

Tabla 1.3. Estimaciones cualitativas recogidas en la bibliografía de los sistemas orgánicos frente a los inorgánicos. Los códigos indican: ++ mucho mejor, + mejor, 0 igual, - peor, – mucho peor. Modificado de Gomiero *et al.* (2011).

Indicador	Estimación cualitativa			
Agronómico				
Productividad por ha	+	0	-	-
Biodiversidad				
De cultivos	++	+	0	
Floral	++	+		
Faunística (sobre el suelo)	++	+		
Diversidad del hábitat	++	+	0	
Efecto en control de plagas y polinizadores	++	+		
Características fisicoquímicas del suelo				
Materia orgánica	++	+	0	
Estructura	++	+	0	
Biología del suelo	++	+	0	-
Biomasa microbiana	++	+		
Actividad microbiana	++	+		
Micorrizas	++			
Biodiversidad	++	+		
Efecto en control de plagas	++	+	0	
Agua del suelo y superficial				
Lixiviado de nitrato	++	+	0	-
Pesticidas	++			
Emisiones de gases de efecto invernadero				
GEIs por ha	++	+		
GEIs por T de biomasa		+	0	
Entradas y salidas				
Uso de nutrientes		+		
Uso del agua		+	0	
Uso energético por ha	++	+		
Uso energético por T de biomasa		+	0	-
Bienestar animal y salud				
Ganadería		+		
Salud	++	+		
Calidad del producto alimenticio				
Residuos de pesticidas	++	+		
Nitrato		+	0	-
Micotoxinas		+	0	-
Metales pesados		+	0	-
Antibióticos	++			

corral presentan las emisiones más bajas, por lo que su uso podría ser una alternativa para la mitigación de estos gases (Akiyama *et al.*, 2004, Aguilera *et al.*, 2013). También se ha demostrado que cultivos de maíz fertilizados de forma orgánica a largo plazo toleran mejor los años de sequía y generan mayor producción que los fertilizados de forma convencional; o que tras un periodo medio de aclimatación, en años de lluvias normales, las producciones de grano llegan a equipararse a los campos fertilizados con abono de síntesis

(Pimentel *et al.*, 2005, van Diepeningen *et al.*, 2006, Gomiero *et al.*, 2011) y que la pérdida de nitrato por lixiviación es significativamente menor (Kramer *et al.*, 2006).

En la actualidad, como alternativa a la fertilización convencional, se plantean diversas opciones, entre las que destacan los abonos orgánicos de muy diverso origen animal o vegetal, las formulaciones basadas en sustancias húmicas, los biofertilizantes, los

fitofortificantes o los bioestimulantes. En el caso de los insumos procedentes de restos vegetales, se trata de extractos metabólicamente activos que actúan a través de mecanismos diferentes a los de los fertilizantes (Calvo *et al.*, 2014); están compuestos por una amplia gama de sustancias (aminoácidos, ácidos orgánicos, polisacáridos, oligopéptidos, polipéptidos, vitaminas, ácidos húmicos y fúlvicos u otros reguladores del crecimiento) y/o microorganismos que estimulan los procesos naturales implicados en la asimilación de nutrientes, pueden beneficiar el crecimiento de la planta y mejorar su tolerancia a los estreses abióticos, en especial el estrés hídrico y el salino (du Jardin, 2015), así como a estreses bióticos según apuntan algunos estudios (El Hadrami *et al.*, 2010, Yin *et al.*, 2010). Estos extractos proporcionan pequeñas dosis de compuestos activos para el metabolismo vegetal, de modo que ahorran a las plantas gastos energéticos en momentos de estrés y producen un efecto similar al de las hormonas, induciendo en la planta la síntesis de bombas de protones y proteínas de transporte, afectando a la glicólisis y a los enzimas del ciclo de Krebs (Puglisi *et al.*, 2013, Canellas & Olivares, 2014). Asimismo, estos compuestos pueden actuar como complemento de aminoácidos de alto consumo, incentivar la formación de sustancias biológicamente activas o antioxidantes, regular el metabolismo de microelementos, incrementar la síntesis de polifenoles como mecanismo de defensa o bien mejorar la regulación fisiológica bajo condiciones de estrés (Saborío, 2002). No obstante, su uso, en general, está poco extendido debido a que, aunque existen algunos estudios de su aplicación en diferentes cultivos, en general la cuantificación de su efectividad se encuentra aún por evaluar.

Además, existe una problemática añadida: el sustrato preferencial para el crecimiento de plántulas en vivero es la turba de *Sphagnum*, tanto en manejo convencional, como ecológico. Su valor radica en su capacidad de retener grandes cantidades de agua, aire y nutrientes en formas rápidamente asimilables, lo que genera condiciones idóneas para el cultivo vegetal, facilitando una germinación exitosa y un crecimiento rápido. No contiene propágulos de malas hierbas ni patógenos animales, es estable durante los periodos de almacenamiento, limpio en el manejo, de precio razonable, de pH bajo y biodegradable (Robertson, 1993). Sin embargo, la explotación de las turberas cada vez se encuentra más cuestionada, debido a que es un recurso limitado y su consumo implica una alteración medioambiental importante, así como la carestía de una turba de calidad, especialmente en países sin turberas (Abad *et al.*, 2001). Por ello, desde hace varios años se ha tra-

tado de sustituir este sustrato por otros medioambientalmente más sostenibles que sean equiparables en propiedades y estabilidad a la turba de *Sphagnum*. Estas alternativas son normalmente un subproducto de alguna actividad agrícola o proceso industrial, rico en nitrógeno y fósforo, fuente que varía dependiendo de la localización del cultivo y/o de la actividad predominante de la zona: por ejemplo, la pasta resultante del proceso de prensado de los frutos en la industria olivera (Benítez *et al.*, 2000), los lodos generados del tratamiento de aguas residuales (Abad *et al.*, 2001) o algas (Verkleij, 1992, Arthur *et al.*, 2003).

1.6.1. La alternativa de los insumos orgánicos: Los bioinsumos

Los insumos biológicos de uso en agricultura surgen como herramienta para dar respuesta a la demanda de los mercados mundiales por alimentos de alta calidad, producidos en forma amigable con el medioambiente, trazables e inocuos. Su utilización busca evitar, en la medida que sea posible, el uso de fertilizantes, plaguicidas, fitoreguladores y otros agroquímicos sintéticos de alta residualidad (Altier *et al.*, 2012).

Los insumos biológicos o “Bioinsumos” son productos de origen biológico, formulados con microorganismos (principalmente algas, bacterias y hongos), con compuestos activos derivados de ellos, o con mezclas de ambos, que tienen diversas propiedades beneficiosas tanto para los suelos, como para las plantas. Los microorganismos que se utilizan en las diferentes formulaciones mantienen una estrecha relación asociativa con las plantas, debido a que éstas ofrecen hábitats muy propicios para su crecimiento. Diferentes órganos de la planta, especialmente aquellos ricos en nutrientes y agua, sus tejidos y sus superficies pueden ser adecuados para la proliferación de microorganismos, destacando la filosfera, el tejido vascular y la rizosfera (Andrews & Harris, 2000, Beattie, 2006). Es en la rizosfera, región que incluye las raíces y el suelo circundante, donde tiene lugar una interacción vital entre plantas, suelo y microorganismos debido a su elevado contenido en energía y carbono procedente de los compuestos producidos y excretados por las raíces (Pinton *et al.*, 2001). En esta zona se concentra una gran actividad metabólica y se crea un ambiente dinámico en el que diferentes formas microbianas conviven en equilibrio; en general, el componente principal corresponde al dominio de las bacterias, con densidades de alrededor de 10^9 células por gramo de raíz; el dominio eucariota, que incluye hongos filamentosos, levaduras, algas y protozoos, oscila entre 10^5 - 10^6 células por gramo

de raíz en el caso de los hongos y 10^2 - 10^3 en el caso de las algas y los protozoos (Beattie, 2006); además se encuentran en el suelo virus y bacteriófagos, con una densidad de 10^8 - 10^9 células por gramo de suelo (Ashelford *et al.*, 2003).

En función de la interacción beneficiosa que se establece entre los mencionados microorganismos y la planta, se distinguen dos grandes grupos de Bioinsumos. El primero lo constituyen los denominados Biopesticidas, Biocontroladores o agentes de control biológico, que favorecen la salud y el crecimiento vegetal frente a patógenos y parásitos de las plantas, mediante la producción de antibióticos, competencia por los nutrientes, parasitismo, inhibición de las toxinas patógenas o resistencia inducida (Vessey, 2003) entre otros. El segundo lo constituyen los Biofertilizantes, compuestos básicamente por microorganismos transformadores de materia orgánica, bacterias fijadoras de nitrógeno y/o solubilizadores de fósforo, además de bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento (PGPR); estas PGPR favorecen la nutrición de la planta, así como su crecimiento mediante la solubilización de nutrientes y la producción de fitohormonas (Podile & Kishore, 2006, Nihorimbere *et al.*, 2011) que modulan el pool hormonal endógeno de la planta modificando la morfología, la superficie y la actividad enzimática radical, lo que proporciona una mejor y más eficiente absorción mineral (Kloepper *et al.*, 1991, Zahir *et al.*, 2003, Gamalero *et al.*, 2004). Cabe destacar que muchas veces una misma cepa microbiana posee mecanismos múltiples que permiten explotar su capacidad para formularlo como biofertilizante o biocontrolador (Altier *et al.*, 2012).

El creciente interés por este tipo de productos se debe a las ventajas que ofrecen frente a los pesticidas y fertilizantes de síntesis química, destacando: ser más seguros, reducir significativamente el daño medioambiental, mostrar una actividad más específica, ser efectivos en pequeñas cantidades, ser capaces de multiplicarse tras su aplicación, pero también de ser controlados por las plantas o por los microorganismos endógenos, presentar procesos de descomposición más rápidos, ser menos propensos a inducir resistencia en los organismos patógenos y plagas y pueden ser utilizados tanto en agricultura orgánica como convencional (Berg, 2009). La cada vez mayor demanda por parte de los agricultores unida a *“la evolución del progreso técnico y científico que ha facilitado el desarrollo de nuevos productos fertilizantes que incorporan microorganismos cuya acción es facilitar la disponibilidad de nutrientes para la planta ha obligado a revisar*

en profundidad el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes” y ha dado como resultado la publicación del Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el anterior Real Decreto con el fin de permitir su incorporación al registro de productos fertilizantes.

1.6.2. El caso particular del té de compost

La agricultura genera gran cantidad de residuos tras la cosecha, entendiéndose como tal aquellas fracciones de un cultivo que no constituyen la cosecha propiamente dicha, así como a aquella parte de la cosecha que no cumple con los requisitos de calidad mínima para ser comercializada como tal (Martínez, 2006). Los cultivos hortícolas son unos de los principales generadores de residuos orgánicos, especialmente los que se encuentran dentro de los sistemas hortícolas intensivos dedicados a la producción de hortalizas bajo invernadero. La superficie de cultivo bajo cubierta en España se aproxima a las 79.000 ha, de las cuales el 95,5% corresponde a la producción de hortalizas. Andalucía, con un 72% del total nacional, y Almería en particular, concentran la mayor parte de la superficie de cultivo protegido (COAG, 2009). Se estima que en Almería sólo los desechos vegetales de invernadero representan más de un millón de toneladas de restos orgánicos al año (Urrestarazu *et al.*, 2005). Pero además de la agricultura, hay que tener también en cuenta a la actividad forestal y a la jardinería por ser generadoras de gran cantidad de residuos vegetales.

El sistema de manejo de todos estos residuos consiste, generalmente, en acumularlos al aire libre para facilitar su desecación y disminución de volumen, como paso previo a su vertido o incineración; lo que genera graves problemas medioambientales. Por una parte, debido al depósito y abandono de los mismos en las zonas de cultivo y cercanías de los invernaderos los convierte en fuente de lixiviados y de emisión de gases y, focos de plagas y vectores de enfermedades. Por otra parte, pueden estar contaminados por restos de productos fitosanitarios y, su incineración puede emitir a la atmósfera compuestos potencialmente peligrosos (Mendoza, 2010).

El compostaje se presenta como una solución estratégica y ambientalmente aceptable a la problemática planteada por la gran cantidad de residuos generados por las explotaciones agroforestales que, además tiene un gran potencial en la agricultura ecológica. Se trata de un proceso bio-oxidativo controlado, es decir, es un proceso biológico aerobio, en el que intervienen nume-

rosos y variados microorganismos, que se desarrolla sobre sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido. En el proceso, bajo condiciones controladas, los residuos reducen su peso, volumen y humedad mientras son transformados en un producto final, llamado compost, con una materia orgánica estabilizada, higienizada (libre de compuestos fitotóxicos y patógenos) y con ciertas características húmicas (Zucconi & Bertoldi, 1987), que lo valorizan al poder ser utilizado como insumo agrícola beneficioso tanto para el suelo como para los cultivos (Moreno & Moral, 2008).

En función de las características del compost, éste puede ser aplicado como enmendante orgánico, actuando sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, como abono, sustrato de cultivo en vivero, jardinería o recuperación de suelos degradados entre otros (Ansorena *et al.*, 2012). Pero además de su aplicación directa en forma sólida, este compost puede ser utilizado como base para la obtención de extractos acuosos, que son denominados de diferentes formas, como por ejemplo té de compost, extracto acuoso fermentado o macerado de compost, con probados efectos beneficiosos para las plantas y para el suelo (Gharib *et al.*, 2008, Pant *et al.*, 2012). Igualmente, ofrecen la ventaja, con respecto al compost, de poder ser aplicados a través de sistemas de riego presurizado, por lo que su uso puede adaptarse en sistemas de producción orgánica de cultivos bajo condiciones de invernadero (Rippy *et al.*, 2004).

En los tés de compost (CT o Compost Tea en inglés) se encuentran presentes poblaciones de microorganismos, muchos de ellos beneficiosos, principalmente de los géneros *Bacillus*, el género más abundante según Kim *et al.* (2015) hasta un 60%, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Droffner *et al.*, 1995), que muestran una efectiva capacidad supresora de microorganismos fitopatógenos (Weltzien, 1991, Scheuerell & Mahaffee, 2002, Scheuerell & Mahaffee, 2004, Siddiqui *et al.*, 2009), una mejora de la fertilidad del suelo (Naidu *et al.*, 2010) y una estimulación de los enzimas implicados en la defensa de la planta frente a patógenos (Siddiqui *et al.*, 2009).

Asimismo, con objeto de enriquecer el extracto para otorgarle mayores propiedades fertilizantes, es posible añadir diferentes aditivos, bien antes o durante el proceso fermentativo, encaminados a incrementar o mantener la población microbiana y/o para eliminar microorganismos patógenos, como microorganismos directamente (Scheuerell & Mahaffee, 2004), melazas (Duffy *et al.*, 2004), pescado hidrolizado, roca pulveri-

zada, algas solubilizadas o ácido húmico (Ingham, 2005, Naidu *et al.*, 2010).

Existen dos tipos de té de compost en función de si el proceso oxidativo de la materia orgánica se da en aerobiosis o no. El más estudiado por su actividad supresora de microorganismos patógenos es el té de compost no aireado (TCNA) y el té de compost aireado (TCA). En el caso del compost no aireado (TCNA) el tanque de fermentación es un contenedor abierto en el que el compost se mezcla directamente en el tanque con el agua en una proporción que oscila entre 1:4 y 1:10 y el tiempo de retención de la mezcla oscila entre 1 y 21 días, a 15-25°C en los que la mezcla permanece prácticamente sin remover más que cada tres días para permitir la liberación de los microorganismos de las partículas de compost. Es un proceso económico y fiable, pero al producirse en anaerobiosis suelen producirse olores fétidos; la duración de la fermentación ha de ser establecida empíricamente en función de los productos y no es necesaria su dilución para la aplicación. En cambio, en el caso del té de compost aireado, la materia prima queda retenida en un recipiente perforado en el interior del tanque de fermentación y la mezcla oscila en una proporción compost:agua ente 1:10 y 1:50, que se suele dejar macerando de 18 horas a semanas. Como contrapartida suele ser un proceso más costoso por la maquinaria necesaria para suministrar aire continuamente, es necesario filtrar el producto y añadirle antiespumante y si se deja demasiado poco tiempo de retención, pueden quedar nutrientes residuales que estimulen el crecimiento de patógenos. Las observaciones generales para la producción tanto de TCNA como de TCA es que el contenedor no puede tener productos biocidas, ni la materia prima patógenos; el agua para este proceso ha de ser de clorada y si se añaden nutrientes a la mezcla, es necesario tener en cuenta que proliferan tanto los microorganismos beneficiosos, como los patógenos.

La dilución posterior se realiza con agua y dependerá del uso específico del producto y de la experiencia que se tenga en las aplicaciones previas del mismo (Scheuerell & Mahaffee, 2002).

En general, los factores que determinan las características del extracto acuoso son el método de procesado, la maduración del compost, pero, sobre todo, el tipo de materia prima utilizada para su elaboración (Weltzien, 1990), ya que sus características influyen en gran medida en las propiedades físicas, químicas y biológicas del compost obtenido.

Al igual que ocurre con cualquier otro tipo de biofertilizante, su composición, el modo y la dosis de aplicación, el tipo de sustrato en el que se aplica, la especie vegetal o las condiciones medioambientales son factores que pueden tener incidencia en la efectividad del formulado y, por lo tanto, deben ser evaluados tanto en condiciones de invernadero como de campo a fin de verificar su eficacia y validez.

1.7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

De acuerdo con lo expuesto en los apartados precedentes, esta tesis pretende evaluar el resultado de la aplicación de un té de compost aireado o TCA, sobre diferentes tipos y condiciones de cultivo, a fin de evaluar el comportamiento final de planta, suelo y microorganismos.

Partimos de la hipótesis de que la fertilización con TCA permite un adecuado desarrollo de las plantas, tanto biométrico como fisiológico, obteniéndose una producción equiparable a la de la fertilización convencional, mejorando su composición nutricional y disminuyendo la virulencia de los ataques por parte de hongos fito-

patógenos, por lo que el objetivo general es evaluar su viabilidad como biofertilizante.

Para la consecución de este objetivo general se realizaron análisis comparativos entre los resultados de ausencia de fertilización o riego con agua, riego con fertilizante convencional y riego con TCA, desde diferentes aproximaciones:

1. Valorar la fitotoxicidad del TCA en función de la dosis a nivel de bioensayo.
2. Comprobar la universalidad del producto en diferentes sustratos y especies vegetales evaluados tanto a nivel de laboratorio (microcosmos), como de campo (mesocosmos).
3. Cuantificar los parámetros biométricos, fisiológicos y productivos de las plantas en aras de determinar su calidad.
4. Determinar el efecto del TCA en la respuesta de la planta al patógeno (patosistema *Pinus radiata-Fusarium circinatum*).
5. Analizar la influencia del TCA en las características edafobiológicas, haciendo especial hincapié en la actividad y la diversidad microbiana.



2 Materiales y métodos



2.1. CARACTERIZACIÓN DEL INSUMO OBJETO DE ESTUDIO

El biosusmo empleado, en fase de evaluación previa a su comercialización, es un té de compost aireado o TCA. El proceso de producción consiste en un periodo de maceración de residuos vegetales compostados durante tres meses y una posterior separación de la fracción líquida y la sólida, obteniéndose dos productos finales: la presentación en forma líquida hace viable la incorporación al suelo con cualquier sistema de riego, incluso los más modernos, lo que posibilita una buena distribución del producto y la fracción sólida se puede aplicar como enmienda orgánica para el suelo. A la fracción sólida obtenida tras el proceso de maceración se le ha denominado, en esta tesis, Insumo Agrícola Sólido (IAS). El procedimiento se realiza bajo parámetros de extracción controlados lo que posibilita la estandarización del proceso y, en consecuencia, garantiza la calidad, el rendimiento, la seguridad y la eficacia del producto. La caracterización del producto se realizó en base a parámetros biológicos (metagenoma de los organismos procariotas y recuento e identificación de UFCs), así como físico-químicos.

Por una parte, el análisis del metagenoma se realizó a través de la secuenciación del 16S utilizando el secuenciador de nueva generación MiSeq (Illumina, California, Estados Unidos) en el departamento de Secuenciación y Genotipado de los Servicios Generales de Investigación (SGIKER) de la UPV/EHU, empleando el protocolo

de secuenciación proporcionado por la compañía. Este análisis indicó que la población de procariotas del té de compost estaba compuesta por los siguientes filos: Euryarchaeota (1,37%); Actinobacteria (1,70%); Tenericutes (3,60%); Synergistetes (4,47%); Spirochaetes (4,60%); Firmicutes, perteneciendo un 11,93% a la clase Clostridia y un 3,53% a la clase Bacilli; Bacteroidetes (15,60%) y Proteobacteria (47,09%) y que dentro de este último filo, las clases predominantes fueron: α -Proteobacteria (13,73%), β -Proteobacteria (14,53%), δ -Proteobacteria (11,60%), ϵ -Proteobacteria (2,80%) y γ -Proteobacteria (4,43%) (Figura 2.1). El restante 6,11% pertenece a la clasificación de “otros”.

Por otra parte, la identificación de las especies microbianas cultivables se realizó mediante la siembra de 100 μ L de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y posterior crecimiento en medio LB sólido a 25°C en oscuridad durante 7 días. Además, para poder discriminar los diferentes metabolismos de las especies aisladas en LB, se utilizaron una serie de medios diferenciales y/o selectivos: para el recuento de bacterias del género *Pseudomonas* spp., el agar Cetrimida; para la caracterización de bacterias ácido-lácticas, el medio De Man-Rogosa-Sharpe (MRS); para la caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio, los medios Pikovskaya (PKV) y Pikoyskaya modificado, respectivamente; para el recuento de levaduras, el medio YGC y para la caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno, el medio *Nitrogen Free Bromothymol blue* (NFB). La composición de los medios aquí mencionados se detalla en el Anexo II.

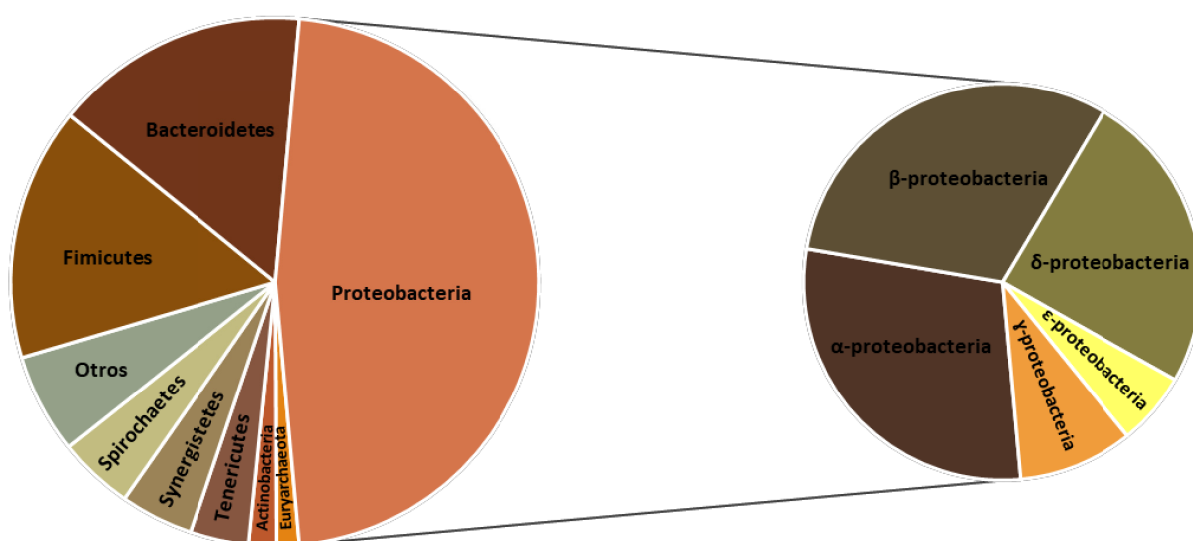


Figura 2.1. Proporción de los diferentes filos procariotas detectados en el análisis metagenómico del té de compost.

Para su posterior identificación, se aisló cada una de las colonias, siendo posteriormente enviadas al laboratorio ALVALAB (Oviedo, España) para la extracción y secuenciación del material genético empleando una modificación del protocolo de Murray & Thompson (1980), que se detalla a continuación: Una porción de las muestras fue homogeneizada con ayuda de un micropistilo en 600 μ L de buffer CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA pH 8,0 20 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM). La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 65°C. Un volumen equivalente de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) fue añadido y mezclado con la muestra hasta su emulsión. Tras centrifugar la mezcla durante 10 min a 10.000 g, el ADN en el sobrenadante fue precipitado con un volumen de isopropanol. Tras 15 minutos de centrifugación a la misma velocidad, el pellet fue lavado en etanol 70% frío, centrifugado de nuevo 2 minutos y secado. Finalmente, fue resuspendido en 100-300 μ L de ddH₂O. La amplificación por PCR fue llevada a cabo con los cebadores ITS1F e ITS4 (White *et al.*, 1990, Gardes & Bruns, 1993) para la región del espaciador interno transcrito ribosomal (ITS ADN_r) de las muestras de hongos, y los cebadores 27F y 1492R (Weisburg *et al.*, 1991) para la región 16S ADN_r de las muestras bacterianas. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 45, 30 y 45 segundos a 94°C, 54°C y 72°C, respectivamente, con una fase final de elongación a 72°C durante 10 min. Los resultados fueron comprobados en un gel de agarosa al 1%, y las reacciones positivas fueron purificadas y secuenciadas con uno de los cebadores de PCR en STAB VIDA (Caparica, Portugal). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los cromatogramas originales para detectar y corregir posibles errores de lectura.

Los microorganismos identificados tras este proceso fueron las especies bacterianas *Ochrobactrum tritici* (24,5% \pm 2,0), *Pseudomonas aeruginosa* (17,4% \pm 3,3), *Gordonia terrae* (15,8% \pm 3,4), *Bacillus subtilis* (14,2% \pm 2,0), *Bacillus licheniformis* (11,9% \pm 1,5), *Bacillus pumilus* (5,5% \pm 0,8), *Bacillus safensis* (4,7% \pm 0,9), *Bacillus velezensis* (4,0% \pm 0,8), *Serratia marcescens* (1,6% \pm 0,1), *Pseudomonas fluorescens* (0,1% \pm 0,0), *Pseudomonas putida* (0,1% \pm 0,0) y las especies fúngicas *Rhodotorula glutinosa*, *Cladosporium ramotenellum*, *Penicillium concentricum*, *Penicillium daelae*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium brevicompactum*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium atroveneretum* y *Mucor moelleri*, que representan un 0,04% de toda la comunidad.

Finalmente, su caracterización físico-química viene detallada en la Tabla 2.1. Dicho análisis fue llevado a cabo en los laboratorios de la empresa Fitosoil S.L.

Para comparar su efecto con el de un manejo convencional de la fertilización, en los ensayos se ha utilizado un fertilizante NPK de uso habitual. En el caso de los ensayos con herbáceas ha sido el fertilizante líquido Universal Flower (7-5-6) (Productos Flower S.A., Lleida), que se ha aplicado junto con el riego, a la dilución recomendada de 1:200 (v/v); en el caso de árboles, ha sido el fertilizante de liberación lenta Plantacote Plus (Aglukon, Düsseldorf, Alemania) mezclado con turba, antes del llenado de los contenedores, a la dosis recomendada de 3g/L.

2.2. ESPECIES SELECCIONADAS

Con el fin de valorar si se trata de un TCA de uso general, que puede ser válido para cualquier cultivo, en la realización de los ensayos se han utilizado 3 especies diferentes, todas ellas de interés agronómico: Girasol (*Helianthus annuus* L.), uno de los cultivos herbáceos más importantes en España en cuanto a superficie cultivada; pimiento (*Capsicum annuum* L.), una de las especies más importantes en cultivo hortícola bajo invernadero; y pino radiata (*Pinus radiata* D. Don), la conífera alóctona más cultivada en toda la cornisa cantábrica, cuyo cultivo proporciona elevados rendimientos económicos.

La semilla de girasol fue la comercializada por semillas Vilmorin, variedad flor grande, de una flor por planta; la semilla de pimiento fue de la variedad pimiento italiano, comercializada por Fitó; la semilla de pino, comercializadas por la Asociación de Viveristas del País Vasco, de categoría cualificada, recogida en Huerto Semillero, procedencia 0.7. Montes vasco-navarros, lote 3409/1034.

En el caso de girasol y pimiento, las semillas fueron germinadas en bandejas semillero de plástico flexible perforado, de 30 x 50 cm y 40 alveolos de 130 cm³. En el caso del pino, las semillas se sembraron en bandejas de plástico rígido ARNABAT, de 35 alveolos de 200 cm³, previa esterilización en superficie con agua oxigenada al 30%, y en agitación, durante 1h y posterior lavado por triplicado con agua destilada estéril. En los tres casos, el sustrato de cultivo fue turba de *Sphagnum*.

Al cabo de un mes, las plantas de girasol y pimiento fueron trasplantadas a bandejas de plástico rígido Quick Pot de 6 alveolos y 1 L de capacidad cada uno,

2. Materiales y métodos

Tabla 2.1. Composición físico-química del TCA. S.M.O.= Sobre muestra original, Ø=Valor por debajo del nivel detectable.

		S.M.O.
Características Físico-químicas	Humedad	99,1 %(p/p)
	Materia seca	0,91 %(p/p)
	Densidad a 20°C	1,011 g/cc
	pH	7,84 Ud. pH
	Conductividad eléctrica a 25°C	14,3 mS/cm
	Potencial de oxido-reducción	-339,25 mV
Nutrientes	Cenizas	0,981 %(p/p)
	Materia orgánica total	Ø
	Carbono orgánico total C	Ø
	Relación C/N _{org}	Ø
	Extracto húmico total	Ø
	Ácidos húmicos	Ø
	Ácidos fúlvicos	Ø
	Nitrógeno total N	0,1449 %(p/p)
	Nitrógeno amoniacal N	0,0183 %(p/p)
	Nitrógeno nítrico N	Ø
	Nitrógeno ureico N	Ø
	Nitrógeno orgánico N	0,1266 %(p/p)
	Fósforo soluble en agua P ₂ O ₅	Ø
	Fósforo soluble en cit. amo. neutro y agua P ₂ O ₅	Ø
	Fósforo total P ₂ O ₅	Ø
	Potasio soluble en agua K ₂ O	0,457 %(p/p)
	Potasio total K ₂ O	0,463 %(p/p)
	Calcio total CaO	0,0131 %(p/p)
	Magnesio total MgO	0,0508 %(p/p)
	Azufre total SO ₃	0,0634 %(p/p)
	Sodio total Na ₂ O	2,037 %(p/p)
	Boro total B	2,56 mg/kg
Hierro total Fe	Ø	
Manganeso total Mn	Ø	
Zinc total Zn	0,92 mg/kg	
Hormonas	Giberelinas	Ø
	Citoquininas	Ø
	Auxinas	Ø
Vitaminas	Vitamina B1 (Tiamina Clorhidrato)	1,21 mg/kg
	Vitamina B2 (Riboflavina)	Ø
	Vitamina B3 (Niacina)	Ø
	Vitamina C (ácido ascórbico)	Ø
	Vitamina E (tocoferol)	Ø
	Vitamina B9 (ácido fólico)	Ø
Macromoléculas	Pigmentos carotenoides totales	0,73 mg/kg
	Polifenoles (floroglucinol)	Ø
Microbiología	Recuento de <i>Escherichia coli</i> por NMP	Ø
	Investigación de <i>Salmonella</i> spp	Ausencia en 25 g
	Recuento de aerobios mesófilos	2,5·10 ⁶ ufc/g

variando el sustrato en función del objetivo del ensayo. En el caso del pino, las plantas se trasplantaron a los 9 meses, al mismo tipo de contenedor Quick Pot, pero de 1,5 L de capacidad, rellenos con turba.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DEL CULTIVO

La eficacia del TCA ha sido evaluada a diferentes niveles, adecuando el tipo de ensayos en función de los objetivos perseguidos.

Para una mejor comprensión de los experimentos, éstos han sido divididos en 5 apartados. Los ensayos correspondientes a los dos primeros se han llevado a cabo en el Invernadero del SGIKER (UPV/EHU) y los correspondientes a los otros tres, en el vivero Martintxune (BASALAN S.A., Diputación Foral de Bizkaia), situado en el Parque de Akarlanda (Erandio, Bizkaia).

Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA (Capítulo 3)

En este apartado se pretende determinar el efecto del té de compost a diferentes dosis en la germinación y crecimiento de las plantas, así como el estudio de la microbiota de los sustratos donde se aplica.

El estudio de biotoxicidad se realizó con semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) y de guisante (*Pisum sativum* L.) como plantas indicadoras. Los tratamientos a evaluar consistieron en distintas concentraciones del té de compost (Control -agua-, TCA puro, TCA diluido 1/5, TCA diluido 1/10) y en la adición de preinóculo, con una concentración de $7,8 \cdot 10^6$ bacterias/mL, de algunas de las especies microbianas presentes en el té de compost, citadas anteriormente. Para elaborar el preinóculo, se tomó, mediante el uso de un asa de siembra, material biológico que se inoculó posteriormente en 30 mL de medio LB, que fue incubado durante 3 días a 25°C en oscuridad para, posteriormente, homogeneizarlo y distribuirlo en eppendorf de 2 mL. Estos eppendorf fueron centrifugados a 13.200 rpm durante 10 minutos, resuspendiendo el pellet en 2 mL de solución salina estéril.

Los bioensayos, que se repitieron dos veces, se realizaron tanto en placa Petri, como en una mezcla 1:1 de perlita:vermiculita, lavada con abundante agua desionizada. Previamente a su colocación en la placa Petri o en la bandeja semillero, las semillas se separaron en lotes de 80, que se dejaron a remojo en agitación durante 5 horas en 200 mL del tratamiento correspon-

diente. Finalizado el remojo, y previo a su utilización, se revisaron con el fin de descartar las defectuosas y seleccionar las de aspecto homogéneo.

El fondo de la placa se cubrió con una fina capa de la mezcla de perlita:vermiculita, que se humedeció con 10 mL del tratamiento correspondiente y se cubrió con un disco de papel de filtro, colocando sobre él 10 semillas, dispuestas radialmente, volviendo a añadir 5 mL del tratamiento correspondiente. Tras cubrir con la tapa, las placas se mantuvieron en una cámara de incubación, durante 6 días, en oscuridad, a una temperatura de 25°C. Se prepararon 5 placas por tratamiento. Al cabo de los 6 días se determinó el número de semillas germinadas y se midió tanto la longitud de la raíz, como la longitud de la parte aérea desarrollada.

A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de germinación relativo (PGR), el crecimiento de la radícula relativo (CRR) y el índice de germinación (IG), cuyos resultados se analizaron según los criterios de Emino & Warman (2004).

$$PGR = \frac{\text{Nº de semillas germinadas en la dilución a evaluar}}{\text{Nº de semillas germinadas en el testigo}} \cdot 100$$

$$CRR = \frac{\text{Elongación de la radícula en la dilución a evaluar}}{\text{Elongación de la radícula en el testigo}} \cdot 100$$

$$IGR = \frac{PGR}{CRR} \cdot 100$$

Además, se emplearon medios específicos para determinar el metabolismo de las especies microbianas utilizadas en este experimento, siendo éstos: medio Pikovskaya para identificar microorganismos solubilizadores de fósforo, medio Pikovskaya modificado para microorganismos solubilizadores de potasio y medio *NFB* para microorganismos fijadores de nitrógeno. La eficiencia en la solubilización de sales/fijación de nitrógeno se expresó como el siguiente índice (Sane & Mehta, 2015):

$$\text{Índice de Solubilización (IS)} = \frac{\text{Diámetro de la colonia} + \text{Diámetro del halo}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Por otra parte, el estudio de crecimiento vegetal y de la microbiota del suelo se realizó utilizando plantas de girasol. Estas plantas crecieron en invernadero (SGIKER, UPV/EHU), sobre dos sustratos diferentes (suelo y turba), durante 12 semanas, con un fotoperiodo de 14 horas, humedad relativa 60/70% (día/noche), temperatura de 25/18°C (día/noche) y una intensidad de luz fotosintéticamente activa o PAR de $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se establecieron 5 tratamientos, tres correspondientes a diferentes dosis de TCA (puro, diluido con agua en proporción 1:5 y 1:10, v/v), una cuarta al fertilizante líquido convencional Flower y la quinta al control, que corresponde al riego únicamente con agua. Cada tratamiento constó de 4 bandejas (24 plantas), a las que se aplicó riego solo con agua cada dos días y riego con el tratamiento de fertilización una vez cada quince días, aplicándose 50 mL/planta de cada dilución.

A la finalización del ensayo se tomaron muestras de suelo rizosférico y se determinaron sus características físico-químicas, la actividad enzimática microbiana, el perfil metabólico del suelo basado en el Biolog y, mediante geles de DGGE, la riqueza específica de la microbiota. Como en el ensayo anterior, se determinó el crecimiento de las plantas mediante caracterización biométrica, mediante la biomasa, el contenido en clorofilas y la fluorescencia.

Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato (Capítulo 4)

En este apartado se perseguía evaluar el crecimiento de plantas de pimiento germinadas en diferentes sustratos y la caracterización físico-química de los mismos; así como caracterizar morfohistológicamente plantas de pimiento crecidas en turba esterilizada y sin esterilizar para estudiar si la aplicación de los compuestos y/o microorganismos presentes en el TCA ejerce algún efecto en los tejidos de la planta.

En la primera parte se cultivaron plantas de pimiento italiano en el invernadero del SGIKER, durante 12 semanas, con un fotoperiodo de 14 horas, una humedad relativa de 60/70% (día/noche), temperatura de 25/18 °C (día/noche) y PAR de 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los contenedores se rellenaron con 3 sustratos diferentes: 1) Turba de *Sphagnum*, 2) suelo vegetal procedente de un bancal del vivero Martintxune y que en origen era un terreno de pradera, y 3) una mezcla del mencionado suelo vegetal con el TCA en proporción 1:1 (v/v). Se rellenaron 12 bandejas con cada tipo de sustrato y, una vez sembradas, se dividieron en tres bloques, cada uno de los cuales, compuesto por 4 bandejas (24 plantas), recibió diferente tratamiento de fertilización: solo agua, fertilizante líquido convencional y el TCA 1:5 (v/v). A todos los tratamientos se les regó con agua cada dos días y, una vez cada quince días, se aplicó el tratamiento de fertilización correspondiente, aplicándose 25 mL/planta de TCA. A la finalización del ensayo se tomaron muestras de suelo rizosférico y se determinaron sus características físico-químicas, la actividad enzimática

microbiana y el perfil metabólico del suelo basado en el Biolog. Además, se determinó el crecimiento de las plantas mediante la caracterización biométrica.

En la segunda parte se estudió la disposición morfológica del sistema radical y la parte aérea de las plantas de pimiento crecidas sobre turba esterilizada y sin esterilizar. Además, se realizaron secciones del peciolo y del tallo, que fueron observados al microscopio óptico, para analizar si existían diferencias en la distribución con respecto al control, añadiendo en el caso de los peciolos un tinte amilófilo, el lugol, para detectar si había cambios en la abundancia y disposición del almidón. Finalmente, se realizó un conteo del número de estomas en el envés de las hojas. Para ello, se colocó una capa de esmalte sobre el envés, dejándolo secar durante 30 segundos para posteriormente colocar encima un film adhesivo, dejarlo secar durante 5 minutos y retirarlo, llevando con él la huella de la epidermis. El film adhesivo se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio óptico.

Valoración de la calidad del sistema suelo-planta (hortícola) en función de la fertilización en condiciones de campo (Capítulo 5)

Con el fin de determinar el efecto del tipo de fertilización en las diferentes fases del cultivo de pimiento se llevó a cabo un estudio del ciclo completo de producción de pimiento, con una fase inicial, la fase de semillero, que tuvo lugar en el invernadero del SGIKER y una fase de crecimiento en condiciones reales de campo, que se desarrolló en los terrenos del vivero Martintxune.

La semilla de pimiento se sembró en bandejas semillero con turba a primeros de mayo y, una vez germinadas, se dejaron crecer durante un mes, con riego a demanda, fotoperiodo de 14 horas, humedad relativa 60/70% (día/noche), temperatura 25/18 °C (día/noche) y PAR de 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las 60 bandejas se repartieron en tres bloques, distribuidos por la mesa de cultivo en un diseño aleatorizado; cada uno de los bloques, formado por 10 bandejas (60 plantas) recibió diferente tratamiento de fertilización: solo agua, fertilizante líquido convencional y TCA. Los insumos se aplicaron en el momento de la siembra de la semilla (una dosis inicial) y una vez a la semana, en dosis de 25 mL/planta.

Al mes de germinadas, se seleccionaron al azar 10 plantas de cada tratamiento, de las cuales se recolectó el sustrato rizosférico para posteriormente ser caracterizadas. La evaluación de la planta consistió en la determinación de su biometría, del contenido en clorofila de

Tabla 2.2. Composición físico-química de los suelos de los bancales una vez fueron incorporadas las enmiendas y antes del cultivo.

	Arenoso	Arcilloso	IAS
pH	6,45	7,43	7,68
Materia orgánica oxidable (%)	1,14	8,49	7,00
Carbonatos (%)	0,00	0,00	12,11
Relación C/N	8,28	8,81	11,63
Nitrógeno total (%)	0,08	0,56	0,35
Fósforo asimilable (ppm)	5,08	282,63	73,18
Potasio asimilable (ppm)	47,00	2.977,00	746,00
Calcio asimilable (meq/100g)	4,04	23,96	20,61
Magnesio asimilable (meq/100g)	0,22	3,73	3,08

las hojas, de su fluorescencia, y de las actividades enzimáticas fosfatasa, nitrato reductasa y glutamina sintetasa. El resto de las plantas fueron trasplantadas a campo, a primeros de junio. Se dispusieron a lo largo de tres bancales de 3 m de ancho por 10 m de largo, en bloques de 3x2 plantas y dos bloques por tratamiento (un total de 12 plantas por sustrato y por tratamiento de fertilización). La distancia entre plantas fue de 50 cm a lo largo del bancal y 1 m a lo ancho del mismo.

La diferencia entre los bancales fue el tipo de enmienda añadida al sustrato base, compuesto por suelo vegetal, procedente de una pradera adyacente y al que se le habían quitado los 10 cm superiores, correspondientes al sustrato herbáceo. Así, en el primer bancal, al que se denominó “Arenoso”, el suelo se mezcló con arena (2:1, v/v) con el fin de incrementar la aireación debido a que el suelo base era muy arcilloso y tendía a saturarse de agua. El segundo bancal, denominado “Arcilloso”, fue mezclado con estiércol (1:1, v/v) madurado durante un año. En el tercer bancal, denominado “IAS”, el suelo se mezcló con el insumo sólido en proporción 1:1 (v/v). En los tres casos, previamente a la aplicación de la enmienda, el suelo vegetal fue removido para fragmentarlo y airearlo; tras aplicar la enmienda, se pasó nuevamente el rotavator hasta conseguir una mezcla homogénea. Tras la preparación de los bancales, y en el momento previo al trasplante, se tomaron muestras de suelo de tres puntos situados a lo largo del bancal. La analítica, realizada por Neiker-Tecnalia (Derio), nos permitió conocer las características básicas de cada bancal (Tabla 2.2).

Una vez establecidas las plantas, cada bancal se dividió en tres partes, un tercio correspondiente al tratamiento de fertilización convencional con abono líquido Flower, otro tercio correspondiente a la fertilización

con el TCA y un tercero que no fue fertirrigado y que únicamente recibió el agua de riego y de lluvia.

Las plantas crecieron en los bancales de junio a octubre, momento en el que se dio por finalizado el ciclo de producción; en ningún momento el cultivo estuvo sometido a déficit hídrico debido al manejo del riego, sin embargo, al ser un cultivo al aire libre, sí que estuvo influenciado por las variaciones de temperatura, humedad relativa y viento. A los 30 días del trasplante en los bancales comenzó la producción de pimientos. A partir de ese momento, cada 10 días se recogieron los frutos de cada planta, y se anotó el número de pimientos, así como la biometría de los mismos, en una muestra seleccionada al azar de 8 pimientos por tratamiento. A los 70 días del trasplante, correspondiente a mediados del ciclo de cultivo y coincidente con el momento de máxima producción, se llevó a cabo una caracterización de las hojas de pimiento. Para ello, en cada uno de los tratamientos se seleccionaron al azar 4 plantas, de las que se recogieron 6 hojas de la zona baja, 6 hojas de la zona media y otras 6 hojas de la zona alta. Se caracterizaron biométricamente y se determinó su contenido relativo en clorofilas y la fluorescencia emitida. A la finalización del ensayo, se determinó la biometría de todas las plantas y se recolectó el sustrato rizosférico de 5 plantas por tratamiento. Tanto este sustrato, como el recolectado al inicio, en el momento del establecimiento de las plantas, se almacenó a 4°C hasta su utilización para la determinación de sus características físico-químicas, la actividad enzimática microbiana y el perfil metabólico del suelo.

Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal (Capítulo 6)

La producción de planta de *Pinus radiata* se llevó a cabo en el vivero Martintxune. La semilla se sembró en

bandejas ARNABAT (alveolos de 200 cm³), sobre turba. Se sembraron 30 bandejas (1050 plantas), que se dividieron en tres lotes de 10 bandejas (350 plantas), cada uno de los cuales recibió un tratamiento de fertilización diferente: “Control”, en el que las plantas únicamente recibieron agua durante todo su crecimiento; “Convencional”, en el que el fertilizante de liberación lenta Plantacote Plus (14:18:15 NPK + 2 Mg, Aglukon, Düsseldorf, Alemania; 8 meses de duración) se mezcló con el sustrato de turba previamente al llenado de las bandejas; “TCA”, en el que las plantas fueron fertirrigadas con TCA, aplicándolo una vez al mes, regando cada planta con 50 ml de una dilución 1:5 (v/v).

Las plantas crecieron, bajo túnel abierto, con riego a demanda, hasta los 9 meses, momento en el que se seleccionaron 25 plantas al azar de cada tratamiento y se caracterizaron con el fin de evaluar el efecto de la fertilización a la finalización de la fase de vivero. La caracterización se realizó en base a la altura, el diámetro a nivel de cuello de raíz y el peso seco (raíz, tallo y parte aérea), lo que permitió calcular el Índice de Calidad de Dickson (Dickson *et al.*, 1960). Asimismo, se determinó el contenido en clorofilas en las acículas y se analizó su contenido en macronutrientes N-P-K-Mg. Posteriormente, 60 plantas de cada tratamiento se trasplantaron a contenedores QuickPot™ (alveolos de 1600 cm³), empleando la misma mezcla de sustrato. Un lote, compuesto por 30 plantas por tratamiento, se trasladó a una cámara de condiciones controladas donde, previa aclimatación de un mes, se inocularon con el hongo *Fusarium circinatum* con el fin de evaluar su susceptibilidad al patógeno. Otras 30 plantas siguieron creciendo en el vivero con los mismos tratamientos de fertilización, pero en exterior, hasta los 17 meses, momento en el que se trasladaron a la cámara de crecimiento para, previa aclimatación de un mes, testar su susceptibilidad. En ambas tandas, la susceptibilidad al patógeno se evaluó mediante aplicación de inóculo esporal y seguimiento de sintomatología de la enfermedad, así como la determinación del grado de daño en base al chancro formado y al nivel de afectación de los tejidos del tallo. Por último, en estos pinos se cuantificó, al final del experimento, la cantidad de hongo que había conseguido penetrar en los tejidos del tallo y las acículas, se midió su contenido en hormonas y se calculó la expresión relativa de genes relacionados con la defensa a 2 dpis.

El resto de las plantas fueron trasplantadas a campo, a una parcela situada en el término municipal de Laukiz (Bizkaia), en una zona de especial incidencia del hongo patógeno. La plantación se estableció mediante un di-

seño de bloques aleatorizados al azar, con 3 tratamientos (Control, Convencional y TCA), 8 bloques por tratamiento y 12 plantas por bloque, manteniendo una distancia de 1 m entre ellas. En esta parcela se llevó a cabo el seguimiento periódico del arraigo de las plantas en base al cálculo del porcentaje de marras, así como de su crecimiento en altura y diámetro a nivel de cuello de raíz. Para terminar, se realizó un corte en el tallo a las plantas de los bloques 1,3,5 y 7 para comprobar si *Fusarium circinatum* era capaz de infectarlas. Tan pronto como las primeras plantas mostraron síntomas evidentes de decaimiento, se extrajeron las acículas más próximas a la zona necrótica de cada uno de ellos y se preservaron en nitrógeno líquido hasta su llegada al laboratorio, para realizarles una q-PCR específica para este fitopatógeno.

Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo (Capítulo 7)

Se tomaron, por triplicado, muestras de 10 g de suelo rizosférico de , de los ensayos de los capítulos 5 y 6, previamente tamizado, que se diluyeron en 90 mL de solución salina isotónica estéril (0,9% NaCl, pH 7,2 ± 0.2), se agitaron vigorosamente y se dejaron en reposo durante 15 minutos. A continuación, y a partir de esta primera dilución 10⁻¹, se realizaron diluciones 1:10 seriadas hasta la dilución 10⁻⁷. De cada una de las diluciones, se tomaron 100 µL y se extendieron, con ayuda de un asa Digralsky, sobre la superficie de la placa Petri, de cada uno de los medios de cultivo seleccionados: para el recuento de hongos, el medio *Modified Melin-Norkrans* (MMN); para las bacterias en general, el medio de Luria-Bertani (LB) y para la discriminación del género *Pseudomonas* spp. se utilizó el agar Cetrimida. Para cada tratamiento, dilución y medio de cultivo se sembraron 5 placas. Tras la siembra, las placas se incubaron a 28°C y en oscuridad durante 14 días. En este periodo de tiempo, todas las placas se revisaron cada dos días con el fin de determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs/mL), así como de diferenciar los principales morfotipos, tanto fúngicos como bacterianos, crecidos en cada uno de los medios.

Una vez se obtuvieron cultivos axénicos de estos extractos, se procedió a la identificación macroscópica de las colonias, que se realizó teniendo en cuenta características morfológicas como tamaño, color y textura. Asimismo, de los morfotipos fúngicos más característicos, se realizaron observaciones microscópicas con el fin de identificar el género correspondiente a partir de las estructuras reproductoras

principalmente. El proceso de extracción y amplificación del ADN de los morfotipos fue llevado a cabo en ALVALAB (Oviedo, España) empleando la modificación anteriormente descrita del protocolo de Murray & Thompson (1980).

2.4. PARÁMETROS EVALUADOS EN PLANTA

2.4.1. Parámetros biométricos

La caracterización biométrica de las plantas consistió en la determinación de su altura y el diámetro a nivel de cuello de raíz; a continuación, se limpiaron cuidadosamente las raíces para dejarlas libres de sustrato, y las plantas se separaron en raíz, tallo y hojas/acículas. Cada una de las partes se pesó para obtener el peso fresco y, tras introducir el material vegetal en sobres de papel, se secó en estufa a 80°C hasta observar un peso constante. Además, en las plantas de pimiento crecidas en condiciones de campo se determinó la anchura de la copa.

La caracterización biométrica de las hojas consistió en medir la longitud del peciolo, así como la longitud y la anchura de la hoja. Tras fotografiarlas, colocando una escala como referencia, se calculó su área utilizando el programa ImageJ.

En plantas de pino, a partir de la biomasa, se calculó la proporción de hoja (*Leaf Mass Fraction* o LMF), que es la relación de biomasa de hojas y la biomasa total de la planta, la proporción de tallo (*Stem Mass Fraction* o SMF), que es la relación entre la biomasa del tallo y la biomasa total de la planta, y la proporción de raíz (*Root Mass Fraction* o RMF), que es la relación entre la biomasa de la raíz y la biomasa total de la planta.

A partir de los datos de altura, diámetro y biomasa se calculó el Índice de calidad de Dickson (Dickson *et al.*, 1960):

$$\text{Índice de calidad de Dickson} = \frac{\text{Biomasa total de la planta (g PS)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (cm)}} + \frac{\text{Biomasa aérea (g PS)}}{\text{Biomasa radical (g PS)}}}$$

Este cálculo se compone a su vez de otros dos parámetros, que son el cociente de robustez o *Sturdiness quotient*, que compara la altura (en cm) con el diámetro del tallo a la altura del cuello de raíz (en mm) y el cociente entre la biomasa en gramos de peso seco entre la parte aérea (shoot) y la parte radical (root).

La tasa de fotosíntesis neta (A_n) se calculó con un medidor de fotosíntesis portátil Li-Cor 6400 (Lincoln, NE, USA) en acículas intactas, bajo condiciones de luz saturante ($1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y 350 ppm de CO_2 .

2.4.2. Parámetros de producción

La determinación de los parámetros de producción se llevó a cabo en las plantas de pimiento crecidas en condiciones de campo. Se recogieron, cada 10 días, los pimientos que habían alcanzado el tamaño comercial, anotando el número y peso de los pimientos producidos por planta. Además, se determinó la longitud y el diámetro, así como el peso fresco y el peso seco de 8 pimientos de un pool por tratamiento.

En otros 5 pimientos del pool por tratamiento se procedió a determinar el pH y los sólidos solubles totales, medidos como grados Brix mediante un refractómetro, del jugo obtenido tras eliminar las pepitas del pimiento y licuarlo.

Finalmente, otros 5 pimientos por tratamiento fueron enviados, nada más ser recolectados, al laboratorio del CTAEX (Centro tecnológico Agroalimentario, Villafranco del Guadiana, Badajoz), para el análisis del contenido en grasa, proteínas, hidratos de carbono y polifenoles.

2.4.3. Contenido en nutrientes

El contenido en macro y micronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu, Zn, B) fue determinado en los laboratorios de Neiker-Tecnalia (Derio) a partir de material foliar seco.

2.4.4. Fluorescencia de la clorofila y contenido en pigmentos

La fluorescencia de la clorofila se midió en base al índice Fv/Fm, con el fluorímetro portátil Fluorpen Z990 (Photon Systems Instruments), tras aclimatación de 20 minutos a la oscuridad.

Con respecto al contenido en pigmentos, el contenido relativo en clorofilas se midió con el SPAD 502 (Minolta), en la misma hoja utilizada para la medida de fluorescencia. En ambos casos, el valor obtenido fue la media de dos medidas realizadas en la mitad de la hoja, en la zona de mayor anchura.

Por otra parte, el contenido en pigmentos también se midió espectrofotométricamente en un pool de

hojas/acículas obtenido de 5 plantas por tratamiento. Para ello, se extrajeron discos de material vegetal fresco hasta conseguir un peso de aproximadamente 50 mg para cada una de las réplicas. Se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL de capacidad y se pipetearon 2 mL de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Se dejaron incubando las muestras con el tapón cerrado durante 45 minutos a 80°C. Pasado ese tiempo, se sacaron las muestras para atemperar en oscuridad, con cuidado de que no se evaporase el solvente y no se concentrase la muestra. Tras hacer la dilución adecuada para que la absorbancia no superase el valor de la unidad, se pipeteó en cubetas de plástico y se midió la absorbancia a $\lambda 665$ (clorofila a), $\lambda 649$ (clorofila b) y $\lambda 480$ (carotenoides). Concluido este proceso, se dejó secando el material vegetal del que se extrajo la clorofila para estimar la concentración por peso seco.

La cantidad de clorofila, se determinó aplicando las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994), expresándose la concentración final como μg de pigmento/mg de peso seco.

Clorofila a ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $(12,47 \cdot \lambda 665) - (3,62 \cdot \lambda 649)$
Clorofila b ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $(25,06 \cdot \lambda 649) - (6,5 \cdot \lambda 665)$
Carotenoides ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $[(1000 \cdot \lambda 480) - (1,29 \cdot [\text{Clorofila a}]) - (53,78 \cdot [\text{Clorofila b}])]/220$

2.4.5. Actividad enzimática

Las actividades enzimáticas *in vivo* se midieron en material fresco, nada más recolectar las plantas; se midieron tanto en raíz como en hojas, excepto en el caso de la fosfatasa, que se midió únicamente en raíz.

2.4.5.1. Fosfatasa *in vivo*

Se partió de 30 mg de peso fresco de raíz, bien triturada, evitando coger fragmentos de raíz principal.

Para comenzar, se diluyó 1/4 cada stock de tampón Skujins 0,1 M (composición detallada en el Anexo II), de pH 5,5 para la fosfatasa ácida y pH 10 para la fosfatasa alcalina. Tras ello, se pipetearon 400 μL de cada tampón, añadiendo inmediatamente los 30 mg de tejido vegetal y 100 μL de *p*-nitrofenilfosfato 0,1 M. El blanco se realizó únicamente con tampón y sustrato, pero sin raíz. A continuación, se incubó la muestra durante 1 hora a 30°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron a la muestra y al blanco 500 μL de NaOH 0,5 N para parar la reacción. Finalmente, se transfirieron 30 μL de esa reacción a una microplaca de 96 pocillos junto con 270 μL de agua ultrapura. La absorbancia

se midió a 410 nm. Para realizar la recta de calibrado, se emplearon los mismos reactivos utilizados durante la reacción, sustituyendo el sustrato, *p*-nitrofenilfosfato 0,1 M, por el producto, *p*-nitrofenol 1 mM.

2.4.5.2. Nitrato Reductasa *in vivo*

Se partió de 100 mg de peso fresco de raíz y hoja, bien triturados, evitando coger fragmentos de la raíz principal y los nervios foliares.

Se colocaron los 100 mg de tejido en 1 mL de tampón de infiltración pH 7,5 y 0,1 M (composición detallada en el Anexo II). Tras ello, se sometieron las muestras a dos tratamientos de vacío de 5 minutos (hasta 40 cm Hg), abriendo lentamente entre cada uno la válvula de cierre para que infiltrase bien el tampón. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 hora en oscuridad a 30°C y una vez transcurrido ese tiempo, en una placa nueva, se añadieron 100 μL de tampón donde se había incubado la muestra, junto con 100 μL de sulfanilamida al 1 % en HCl 1,5 N y 100 μL de NEDA al 0,1 % y se agitó para homogeneizar. El blanco constó de 100 μL de tampón donde se había incubado la muestra, 100 μL HCl 1,5 N y 100 μL de NEDA al 0,1 %. La absorbancia se midió a 540 nm. Para realizar la recta de calibrado, se emplearon los mismos reactivos utilizados durante la reacción, sustituyendo el sustrato, KNO_3 0,05 M, por el producto, KNO_2 1 mM.

2.4.5.3. Glutamina Sintetasa *in vitro*

Se partió de aproximadamente 50 mg de material pulverizado de raíz y hoja, previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. Es recomendable no dejar pasar mucho tiempo desde el procesado hasta la medida, ya que va perdiendo actividad durante el almacenamiento.

Para la extracción del enzima, se dispusieron varios eppendorf vacíos de 2 mL y el material vegetal pulverizado en un contenedor con nitrógeno líquido, echando rápidamente dos paladas de material al nuevo eppendorf para que no se descongelase. Seguidamente, se añadieron a cada eppendorf 2 bolas de vidrio y de 3 a 5 mg de PVPP. A continuación, se colocaron los eppendorf en hielo y se pipetearon 500 μL de buffer de extracción a cada uno (composición detallada en el Anexo II). Para extraer el enzima, se colocaron los eppendorf en soportes fríos en el molino y se mantuvieron en agitación durante 3 minutos a frecuencia 27 s^{-1} . Por último, el extracto se centrifugó dos veces durante 10 minutos a 13.000 rpm, guardando las muestras en hielo hasta el momento de la reacción.

Para la reacción, conservando la microplaca en hielo, se pipetearon 50 μL de muestra y 100 μL de buffer de reacción (composición detallada en el Anexo II) y para los blancos, el mismo procedimiento con tampón de reacción sin ATP. Posteriormente, se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37°C y se pipetearon 150 μL de buffer de parada a cada pocillo (composición detallada en el Anexo II). Para terminar, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente y se pipetearon 200 μL a otra microplaca, evitando el precipitado. La absorbancia se midió a 540 nm. La recta de calibrado se realizó con el mismo volumen de tampón de reacción sin ATP y de tampón de parada, a lo que se adicionó γ -glutamihidroxamato 8 mM.

Para cuantificar la proteína presente en el extracto fue necesario pipetear 10 μL del mismo, diluido 1/10 y añadirle 240 μL de reactivo Bradford diluido 1/5. Tras dejar incubar 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm. La recta de calibrado se realizó con albúmina de suero bovina (BSA) 1 mg/mL.

2.5. INOCULACIÓN CON *Fusarium circinatum* Y EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD

La cepa de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell utilizada en los ensayos ha sido la denominada Fc-GFP1, modificada genéticamente para añadirle el gen de la *Green Fluorescent Protein* colocada tras el gen promotor que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (*Pgpd::GFP*) (Martín-Rodriguez *et al.*, 2013).

2.5.1. Determinación del rango de temperatura

Previamente a la inoculación de las plantas se evaluó la tasa de crecimiento de *F. circinatum* en medio PDA (Agar Patata-Dextrosa) a diferentes temperaturas con el objetivo de determinar las condiciones más adecuadas para la realización de los ensayos. Para ello, se realizaron secciones de 5 mm de diámetro del borde de una colonia de 14 días crecida en PDA y se sembraron en placas Petri de 9 cm de diámetro con PDA fresco, dejándolas crecer a diferentes temperaturas (4°C, 15°C, 25°C, 30°C y 35°C) durante 11 días, en oscuridad. Para determinar el rango en el que se producía un crecimiento óptimo se midió periódicamente (2-3 días) el diámetro de la colonia.

2.5.2. Valoración del efecto del TCA en el crecimiento *in vitro* del patógeno

La valoración se llevó a cabo en medio PDA, al cual se le adicionó el TCA en concentración creciente (0, 25,

50, 75 y 100%), añadido cuando el medio aún no había gelificado. En este ensayo el micelio fue incubado durante 14 días, en oscuridad y a la temperatura determinada como óptima (25°C), en base a los datos obtenidos en el punto 2.5.1.

Se estudiaron las diferencias entre las placas control y los diferentes porcentajes de TCA comparando los siguientes parámetros:

- Área del micelio (cm^2): calculada utilizando el software ImageJ.
- Biomasa del micelio (g PS): el procedimiento para extraer la totalidad del micelio del agar consistió en recortar perimetralmente la colonia, colocarla en un erlenmeyer de 250 mL, adicionar 125 mL de agua destilada, tapar la boca del erlenmeyer con papel de aluminio e introducirlos en el autoclave durante 5 minutos a 120°C para conseguir separar el micelio del agar. Posteriormente, las muestras se secaron individualmente a 80°C durante 48 horas y se pesaron en una balanza (Eng *et al.*, 2003).
- Producción de esporas: Se cuantificó, con una Cámara Neubauer (Celeromics, Valencia, España), el total de esporas extraídas en 10 mL de KCl estéril al 0,5% (p/v) mediante raspado con bisturí de la superficie de la colonia y posterior filtrado del micelio vegetativo con muselina.
- Tasa de germinación: Se extrajeron las esporas mediante el mismo método descrito para la producción de esporas y se sembraron 55 μL de la dilución 10^{-3} en una nueva placa con PDA. Tras la siembra, las placas crecieron durante 7 días en oscuridad a 25°C.

2.5.3. Inoculación de las plantas

La inoculación de las plantas se llevó a cabo utilizando inóculo esporal. Para prepararlo, se sembró, en una placa Petri con PDA, un disco de 5 mm de diámetro del borde de una colonia madura de *F. circinatum*, crecida también sobre PDA. Se mantuvo creciendo a 25°C y en oscuridad durante 14 días, momento en el que se procedió a la obtención de las esporas, dentro de la campana de flujo laminar. Tras añadir suavemente sobre la colonia 10 mL de agua desionizada previamente esterilizada, se procedió al raspado superficial con bisturí, filtrándose a continuación todo el contenido a través de una membrana de muselina estéril a un tubo de centrifuga, también estéril, de 15 mL. Con ayuda de una Cámara Neubauer (Figura 2.2) se procedió a determinar la

2. Materiales y métodos

concentración de esporas mediante la fórmula indicada por el fabricante, contando un total de 15 cuadrados numerados en la figura como “3” y cuyas dimensiones son 0,04 mm² de área y 4·10⁻⁶mL de volumen:

$$\text{Nº esporas / mL} = \frac{\text{esporas contadas} \times 250.000}{\text{número de cuadrados contados}}$$

Una vez calculada la concentración original de la muestra, se realizó una nueva dilución con objeto de ajustar la concentración a 2,5·10⁵ esporas/mL. Para proceder a la inoculación de las esporas en el tallo, se retiró un fascículo foliar completo y con ayuda de una pipeta, se depositó 1 µL en la herida realizada en el tallo (infección equivalente a 250 esporas por pino) independientemente de su talla y calibre (Davis *et al.*, 2002). En las plantas de control negativo de la inoculación, en la herida se colocó 1 µL de agua destilada y estéril. Además, se dejaron plantas sin manipular como controles negativos ambientales.

2.5.4. Evaluación de la respuesta de la planta tras la inoculación

Tras la inoculación, y a lo largo de catorce semanas, se evaluó la severidad de la infección en base a dos escalas de síntomas: 1) estado general de la planta (Tabla 2.3) y 2) volumen de resina secretada (Tabla 2.4).

Para completar el seguimiento de la sintomatología, se realizaron secciones seriadas de tallo, tanto de pinos sin-

tomáticos como asintomáticos, hasta 3 cm por encima y por debajo del punto de inoculación. De este modo, se facilita la observación del chancro en su totalidad y de la progresión del patógeno en sección transversal. Para seccionar los tallos, se emplearon hojas de micrótopo por ser adecuadas para elaborar secciones finas de un material rígido. Las muestras fueron fijadas a 4°C durante 12 horas con *p*-formaldehído al 2,5% (p/v) pH 7, posteriormente lavadas varias veces con PBS 1x (Tampón fosfato-salino) y analizadas bajo un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon, Japón) para observar el chancro y la desestructuración tisular y bajo un microscopio confocal Leica LCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Alemania) para comprobar que el patógeno se hallaba en las regiones con necrosis. La superficie del tallo afectada por necrosis, en corte transversal, se calculó con el programa ImageJ a partir de las fotos realizadas a la lupa.

2.5.5. Cuantificación de la cantidad de patógeno presente en los tejidos de *P. radiata*

Para extraer el material genético se pulverizó, con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, un segmento de 2 centímetros del tallo sobre el punto de inoculación y en el caso de las acículas, aquellas que se encontraban a lo largo del perímetro donde se había realizado la infección.

Para extraer el ADN tanto fúngico como vegetal, se empleó el método de extracción de ADN genómico con CTAB (Composición indicada en el Anexo II) modificado

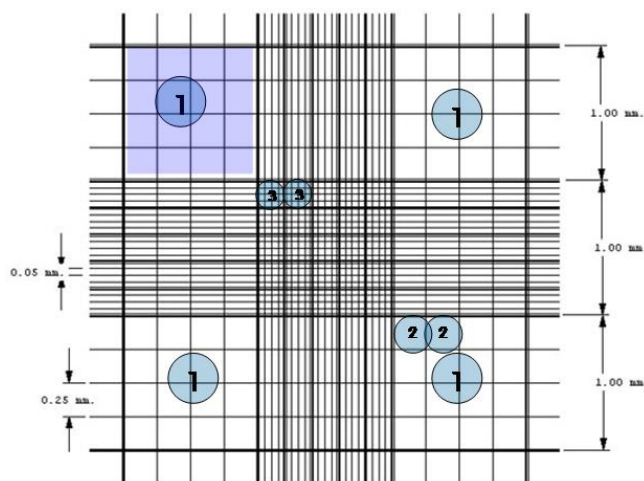


Figura 2.2. Detalle de una Cámara Neubauer o contador celular con todas las opciones de contaje que ofrece. Tomado de <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion-1.php>.

Tabla 2.3. Grados de severidad de la sintomatología que pueden presentar las plantas de *P. radiata* infectadas por *F. circinatum*. Tomado de Correll *et al.* (1991).

Grado	Síntomas
1	Planta saludable sin síntomas de necrosis (verde, vigorosa, sin marchitez)
2	Parte aérea sana, con necrosis justo alrededor del punto de inoculación
3	Parte aérea sana, con necrosis de más de 2 cm en torno al punto de inoculación
4	Marchitez de las acículas y decaimiento del ápice
5	Acículas necróticas y planta muerta por encima del punto de inoculación. Es posible observar acículas verdes por debajo del mismo

Tabla 2.4. Grados de severidad en la exudación de la resina que pueden presentar las plantas de *P. radiata* infectadas por *F. circinatum*. Tomado de Bonello & Blodgett (2003).

Grado	Síntomas
0	Ausencia de exudación
1	Exudación baja de resina. Distancia al punto de inoculación (PI) \leq 5 mm
2	Exudación moderada de resina. Distancia al PI \leq 4 cm
3	Exudación elevada de resina. Distancia al PI $>$ 4 cm

de Möller *et al.* (1992). Durante todo este proceso es obligatorio trabajar en campana de gases, con material previamente esterilizado y utilizando puntas con filtro. Este proceso de extracción consta de dos etapas: en la primera, se precalentaron a 65°C 400 μ L de CTAB + 4 μ L de Ribonucleasa (RNAsa, 100 mg/mL) en tubos eppendorf de 1,5 mL, y se añadieron 100 mg de material vegetal pulverizado de cada órgano; se homogenizó el contenido mediante agitación leve y se incubaron todos los tubos de 15 a 30 minutos a esa misma temperatura, agitando periódicamente con suavidad. Para la precipitación y purificación del material genómico, se añadió un volumen equivalente (400 μ L) de cloroformo:isoamiloalcohol (24:1) y se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm y a 4°C. Tras la centrifugación se recogieron 200 μ L del sobrenadante, que fueron transferidos a un tubo eppendorf nuevo junto con un volumen equivalente de isopropanol frío, dejando incubarse a -20°C de 2 a 24 horas para precipitar el material genético. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 10.000 rpm y a 4°C y se descartó el sobrenadante evitando tocar el precipitado, que se lavó posteriormente con 400 μ L de etanol absoluto frío. Se volvió a centrifugar la muestra y se eliminó todo el etanol posible, dejando evaporar el remanente de etanol en una campana de flujo laminar. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura estéril y se mantuvo a -20°C hasta el momento de cuantificar.

Una vez aislado el material genómico, se comprobó su concentración y pureza mediante la medición del ratio de absorbancia 260/280 en un equipo NanoDrop Lite (NanoDrop™, Massachusetts, Estados Unidos) y se procedió a realizar la PCR a tiempo real. Esta técnica permite cuantificar la amplificación de secuencias diana de los ácidos nucleicos mediante la adición de moléculas fluorescentes en la reacción, que emiten una fuerte señal cuando se intercalan en la hebra duplexa formada por las secuencias complementarias amplificadas. La medida de intensidad de la fluorescencia emitida determina la cantidad de amplicón en la muestra.

Antes de comenzar con la reacción de PCR, se normalizaron las concentraciones de todas las muestras a 10 ng/ μ L de ADN para asegurar que las diferencias observadas tras la amplificación fueran a causa del tratamiento y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida en cada reacción.

Para preparar la reacción se empleó el kit SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) de Takara (Clontech Laboratories Inc., California, Estados Unidos). Los cebadores utilizados en la misma vienen descritos por Martín-Rodríguez *et al.* (2013), estableciendo como gen constitutivo o *Housekeeping* el gen de *P. radiata* *NE-EDLY* o *NLY* y para *F. circinatum* el par de cebadores *FCIR*, que amplifican secuencias de los espaciadores in-

2. Materiales y métodos

tergénicos o IGS del genoma del hongo (loos *et al.*, 2009). Las secuencias de los mencionados cebadores se detallan a continuación:

NEEDLY o NLY (n° acceso GenBank U76757)

NLY-O-F 5'-GCAGTGAGAGCGATGAAAGGAA-3'

NLY-O-R 5'-TCTCCTGGTCCGTGACAATGA-3'

IGS *F. circinatum* (n° acceso GenBank AY249397/AY249403/AJ879950)*

FCIR-F 5'-TCGATGTGTCGTCTCTGGAC-3'

FCIR-R 5'-CGATCCTCAAATCGACCAAGA-3'

*Cada acceso corresponde a una estirpe diferente

Por último, la reacción de PCR se diseñó estableciendo las siguientes concentraciones finales de cada componente: SYBR 1x, 0,2 μ M del cebador 5'-3', 0,2 μ M del cebador 3'-5', ROX 1x y 1 ng/ μ L de ADN en un volumen de reacción final de 15 μ L. El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, California, Estados Unidos), que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, 40 ciclos de anillamiento-elongación a 60°C durante 1 minuto y un ciclo final automático.

Para la *melt curve* se programó una medida continua de fluorescencia emitida en el rango de 60-95°C, aumentando la temperatura 0,3°C por segundo. Tras varias pruebas se pudo determinar que las T_m de los amplicones de NLY y FCIR fueron de 83,7 y 87,5 respectivamente, lo que serviría posteriormente para detectar amplicones no deseados.

Para poder realizar una PCR cuantitativa, se realizaron rectas patrón para cada par de cebadores partiendo de una concentración inicial de ADN genómico conocida, que fue diluida 10⁵ veces de forma seriada. La relación entre el logaritmo de la concentración de ADN y el C_t obtenido tras la reacción de amplificación es inversamente proporcional, de modo que representando esos datos en una gráfica se obtuvo una recta de calibrado donde poder extrapolar la concentración de DNA genómico una vez obtenido el valor C_t de cada muestra problema (Pfaffl, 2004).

Finalmente, una vez conocida la concentración de ADN de hongo y de planta en cada muestra se calculó el ratio resultante (ng ADN hongo/ng ADN pino), que sirvió de parámetro para comparar la influencia del tipo de fertilización en la prevención de la infección por *F. circinatum*.

2.5.6. Cuantificación de la inducción en la expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógeno

2.5.6.1. Extracción y purificación de las muestras de ARN

Para extraer el ARN de la planta, se empleó una modificación del método de Chang y colaboradores (1993), que se detalla a continuación. De nuevo es indispensable trabajar con todo el material estéril y todas las superficies lo más limpias posible. Al tratarse de una respuesta sistémica, no se contemplaron restricciones de material a la hora de pulverizarlo para la extracción, como sí ocurría en el experimento de extracción del ADN, en el que el hongo se encontraba localizado en la franja analizada.

Este proceso también consta de dos fases: la extracción y precipitación del ARN y la purificación. Para iniciar la extracción, se precalentaron 700 μ L de CTAB para extraer ARN (Composición indicada en el Anexo II) a 65°C en tubos eppendorf estériles y rápidamente se añadieron de 100 mg de material vegetal, invirtiendo el tubo para homogeneizar y dejando incubar durante unos 10 o 15 minutos a esa temperatura. Una vez terminada la lisis, se añadió el mismo volumen (700 μ L) de cloroformo:isoamilalcohol y se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C para recoger los 700 μ L de la primera fase y resuspenderlos en otros 700 μ L de cloroformo:isoamilalcohol en un nuevo eppendorf. Se centrifugó una última vez y se transfirió el sobrenadante a otro eppendorf. Se añadió 1/4 del volumen de LiCl a este sobrenadante, se mezcló y se dejó precipitando toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron dos volúmenes de isopropanol frío y se dejó precipitando a -20°C durante 2 horas. Para recuperar los ácidos nucleicos, se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, descartándose el sobrenadante y pipeteando 500 μ L de etanol absoluto frío para lavar el precipitado. Se volvió a centrifugar la muestra durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, se eliminó completamente el etanol y se dejó evaporar el remanente en una campana de flujo laminar. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura autoclavada.

2.5.6.2. Tratamiento con Desoxirribonucleasa o DNAsa

Una vez purificados los ácidos nucleicos el tratamiento posterior para eliminar el ADN de la muestra se realizó con el kit RecombinantDNase I (RNase-free) de Takara

(Clontech Laboratories Inc., California, Estados Unidos) y la reacción se preparó estableciendo las siguientes concentraciones finales: Tampón DNAsa 1x, 40 U de enzima y los 50 µL de ARN purificados en el proceso anterior, en un volumen final de 58 µL. Una vez preparada la reacción se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Para la eliminación del enzima se probaron dos metodologías: la adición de 2,5 µL de EDTA 0,5M y posterior inactivación por calor a 80°C durante 2 minutos y la extracción por fenol-cloroformo, siendo este último método el que más pureza ofreció y el finalmente empleado. Para ello, se pipeteó un volumen equivalente de una solución de fenol-cloroformo 1:1 (v/v), se homogenizó y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C para transferir la primera fase a un nuevo tubo eppendorf. Posteriormente, se añadió 1/10 del volumen de la muestra de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, incubando después a -20°C durante 90 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad (13.200 rpm) a 4°C y se lavó una segunda vez con etanol absoluto. Se centrifugó una última vez, eliminando cuidadosamente el etanol y se dejó evaporar el remanente en una campana de flujo laminar. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura estéril y se mantuvo a -20°C hasta comenzar con la retrotranscripción.

2.5.6.3. Retrotranscripción y preparación de la reacción de q-PCR

Antes de comenzar con la reacción de retrotranscripción, se normalizaron las concentraciones de todas las muestras a 30 ng/µL de ARN para asegurar que las diferencias observadas tras la amplificación fueran a causa del tratamiento y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida en cada reacción.

Las muestras de ARN se retrotranscribieron con el kit PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara (Clontech Laboratories Inc., California, Estados Unidos). La reacción se preparó con las siguientes concentraciones finales: Tampón Primescript 1x, 2,5 µM de oligo DT, 21 ng/µL de ARN y 1 µL de enzima retrotranscriptasa en un volumen de reacción final de 20 µL y se llevó a cabo con el siguiente programa de amplificación: 37°C durante 15 minutos (reacción de retrotranscripción), 85°C durante 5 segundos (inactivación por calor) y enfriamiento a 4°C.

Una vez obtenido el ADN complementario o cDNA, se preparó la reacción de q-PCR con las siguientes con-

centraciones finales: SYBR 1x, 0,2 µM del cebador 5'-3', 0,2 µM del cebador 3'-5', ROX 1x y 2 µL de cDNA. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron las siguientes:

quitinasa clase III o QUI (nº acceso Genbank 4327172) (Boava *et al.*, 2010)

QUI-F 5'-AAATCTTCAGCATCGCCA-3'

QUI-R 5'-CCCAATAGACAGCAATTTCTC-3'

Glucanasa o GLU (nº acceso GenBank 103498635) (Rivera *et al.*, 2002)

GLU-1 5'-TTYGATGTCYMTKKTGGAT-3'

GLU-2 5'-TCRTCARACATRGCAA-3'

Fenilalanina Amonio Liasa o PAL (nº acceso GenBank JQ765748.1) (Jin *et al.*, 2013)

PAL-F 5'-AGAACACGGTGAGCC-3'

PAL-R 5'-CATAGGCAAGCACATA-3'

Chalcona Sintasa o CHS (nº acceso GenBank AJ413277) (De Keyser *et al.*, 2013)

CHS-F 5'-GGGAATCAACGGTTTTGGAA-3'

CHS-R 5'-CTCGGGCTTAAGGCTCAACTT-3'

Hidroximetilglutaril-CoA Reductasa2 o HMG2 (nº acceso GenBank AF110383) (Villar-Luna *et al.*, 2015)

HMG2-F 5'-ATTACCTTCAGAATGAATACGCT-3'

HMG2-R 5'-CTCTCTATGTTTTGTGCTGGGT-3'

El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) y consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, seguida por 45 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, 45 ciclos de anillamiento-elongación a 60°C durante 1 minuto y un ciclo final automático. Para la *melt curve* se programó una medida continua de fluorescencia emitida en el rango de 60-95°C, aumentando la temperatura 0,3°C por segundo.

El cálculo de la expresión se realizó mediante cuantificación relativa, aplicando la fórmula $2^{-\Delta C_t}$, siendo ΔC_t la diferencia entre los C_t del gen incógnita y los C_t del gen constitutivo o *Housekeeping*.

Finalmente, se analizó el contenido en hormonas mediante el envío de muestras de tallo de pinos infectados y no infectados al instituto de investigación CETEMAS (Centro Tecnológico y Forestal de la Madera), en Asturias.

2.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TCA A NIVEL DE MICROBIOTA

2.6.1. Preparación de las muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas a lo ancho y largo de la profundidad de la maceta/bancal, con el fin de recoger la mayor heterogeneidad posible. Para cada tratamiento, las muestras recogidas fueron mezcladas y homogeneizadas y el pool así obtenido se guardó en envases plástico cerrado, manteniéndolo a 4°C hasta su utilización.

2.6.2. Determinación de parámetros físico-químicos

Tras tamizar las muestras con cribas de 2 mm de luz para eliminar piedras, hojarasca y raíces, el suelo se mezcló con agua destilada en tubos de centrifuga de 15 mL en proporción 1:5 (v/v), realizando tres réplicas por cada suelo. Los tubos de las diluciones se mantuvieron en un agitador durante 30 minutos a 100 rpm y se dejó decantar otros 30 minutos para eliminar posteriormente el material particulado que pudiera entorpecer en la medida. El sobrenadante procedente de estas extracciones se utilizó para las medidas de pH, conductividad eléctrica (CE) y potencial de óxido-reducción (Eh). Este procedimiento se basa en el descrito en el BOE-A-1982-1323 para la medida de pH en suelos, modificado ligeramente a nivel del porcentaje de la dilución.

2.6.3. Determinación de la actividad enzimática de la microbiota

Se homogeneizó la muestra de suelo mediante tamizado y se tomaron submuestras de 1g por cada réplica de tratamiento (3 réplicas), más el blanco. Antes de comenzar, los tampones y los sustratos de cada reacción se atemperaron a la temperatura adecuada de incubación (25 ó 37°C).

A continuación, se indica el procedimiento para cada uno de los seis enzimas medidos:

Deshidrogenasa (García *et al.*, 1993, Taylor *et al.*, 2002). Inicialmente, se añadieron a todos los tubos 400 µL de tampón TRIS 100 mM pH 7,0 y 400 µL de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) al 0,5% a las réplicas, mientras que a los blancos se les añadieron 400 µL de agua destilada. Tras agitar en el vórtex, los tubos se cerraron y se incubaron a 25°C durante 4 horas, agitando periódicamente. Transcurrido el pe-

riodo de incubación, se añadió a los blancos 400 µL de INT 0,5% e inmediatamente se centrifugaron a 3500 rpm durante 2 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, se añadieron 8 mL de metanol a todos los tubos. Se cerraron y se agitaron de nuevo en el vórtex. Finalmente, tras centrifugar a 3500 rpm durante 2 minutos, se midió la absorbancia a 490 nm. La recta de calibrado se realizó con violeta de iodinitrotetrazolioformazán (INTF) 100 mg/l en metanol.

Ureasa (Kandeler & Gerber, 1988). Inicialmente, se añadió a todos los tubos 1,75 mL de tampón tetraborato de sodio 100 mM pH 10 y 250 µL de urea 820 mM a los tubos muestra. Posteriormente, se agitaron todos los tubos en el vórtex, se cerraron y se incubaron a 37°C durante 1 hora, agitando periódicamente. Transcurrido el periodo de incubación, se añadió a todos los tubos 6 mL de KCl 2M y a los blancos 250 µL de urea 820 mM e inmediatamente se centrifugaron a 3500 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se diluyeron todos los tubos 16 veces con agua destilada (250 µL en 3,750 mL de agua) y se pipetearon 2 mL de Reactivo A (mezcla a partes iguales NaOH 0,3N, solución de salicilato-nitroprusiato al 17% (p/v) y 0,12% (p/v) respectivamente y agua ultrapura) y 800 µL de dicloroisocianurato al 0,1% (p/v) a cada tubo. Se agitaron de nuevo y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 670 nm. La recta de calibrado se realizó con cloruro amónico 10mg/L.

Arilsulfatasa (Taylor *et al.*, 2002). Inicialmente, se añadió a todos los tubos 1,6 mL de tampón acetato 0,5M pH 5,8 y 400 µL de *p*-nitrofenilsulfato 50 mM a los tubos muestra. Posteriormente, se agitaron todos los tubos en el vórtex, se cerraron y se incubaron a 37°C durante 45 minutos, agitando periódicamente. Transcurrido el periodo de incubación, se añadió a todos los tubos 400 µL de CaCl 0,5M y 1,6 mL de NaOH 0,5M, además de 400 µL de *p*-nitrofenilsulfato 50 mM en el caso de los blancos. Finalmente, se centrifugaron a 3500 rpm durante 2 minutos y se midió la absorbancia a 410 nm. La recta de calibrado se realizó con *p*-nitrofenol 80 mg/L.

Fosfatasa ácida y alcalina (Taylor *et al.*, 2002). Inicialmente, se añadió a todos los tubos 1,6 mL de tampón Skujins 0,1M pH 6,5 (en caso de medir la fosfatasa ácida) y 11 (en caso de medir la fosfatasa alcalina) y 400 µL de *p*-nitrofenilfosfato 50 mM a los tubos muestra. Posteriormente, se agitaron todos los tubos en el vórtex, se cerraron y se introdujeron en el incubador a 37°C durante 45 minutos, agitando periódicamente.

Transcurrido el periodo de incubación, se añadió a todos los tubos 400 μ L de CaCl 0,5M, 1,6 mL de NaOH 0,5M y únicamente a los blancos 400 μ L de *p*-nitrofenilfosfato. Finalmente, se centrifugaron a 3500 rpm durante 2 minutos y se midió la absorbancia a 410 nm. La recta de calibrado se realizó con *p*-nitrofenol 80 mg/L.

β -Glucosaminidasa (Parham & Deng, 2000). Inicialmente, se añadió a todos los tubos 1,6 mL de tampón acetato 0,1M pH 5,5 y 400 μ L de *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida 10 mM a los tubos muestra. Posteriormente, se agitaron los tubos en el vórtex, se cerraron y se incubaron a 37°C durante 45 minutos, agitando periódicamente. Transcurrido el periodo de incubación, se añadió a todos los tubos 400 μ L de CaCl 0,5M y 1,6 mL de NaOH 0,5M, además a los blancos 400 μ L de *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida 10 mM. Finalmente, se centrifugaron a 3500 rpm durante 2 minutos y se midió la absorbancia a 410 nm. La recta de calibrado se realizó con *p*-nitrofenol 1000 mg/L.

2.6.4. Determinación del perfil metabólico del suelo

Se realizó una primera dilución de suelo fresco previamente tamizado (equivalente a 1 g de peso seco) en 9 mL de agua destilada estéril. Las diluciones se dejaron en agitación a 100 rpm durante 30 minutos, tras lo cual se esperó 5 minutos a que decantasen las partículas de suelo. A continuación, se realizaron diluciones seriadas a partir del volumen correspondiente tomado a media altura del tubo y depositado en otro tubo con agua ultrapurificada estéril. Se trabajó con la dilución 10^{-4} por ser la primera en la que el medio pipeteado no presentaba turbidez. Se pipetearon 150 μ L en cada uno de los pocillos de las EcoMicroplates (Biolog) y se dejaron incubados en oscuridad a 25°C durante 8 días, midiendo cada 24 horas la absorbancia a 590 nm en un lector de placas Powerwavex340 (Biotek Instruments, Vermont, Estados Unidos). Los parámetros calculados a partir de las EcoMicroplates fueron:

Velocidad de aclimatación (VA): Tras realizar las diferentes curvas de crecimiento mediante la representación de la absorbancia media diaria (AWCD), se observó que a las 48 horas todos los tratamientos habían iniciado la fase exponencial de crecimiento y se calculó el área bajo la curva para este tiempo. El cálculo de este parámetro se realizó como lo describen Choi & Dobbs (1999).

$$\text{Área trapezoidal} = \sum \frac{AWCD_i + AWCD_{i-1}}{2} \times (t_i - t_{i-1})$$

AWCD: Σ Absorbancias discretas del conjunto de los 31 pocillos, habiendo restado la absorbancia a tiempo 0 y el pocillo sin sustrato (A1, A5 y A9).

Número de sustratos utilizados (NSU): Se establece como sustrato utilizado aquel que sobrepasa el valor 0,25 de absorbancia (Epelde *et al.*, 2008, Epelde *et al.*, 2009, Epelde *et al.*, 2010). Se calcula tras los 8 días de incubación de los extractos de los suelos en las microplacas.

Eficiencia en el uso del nitrógeno (NUSE) resultante de dividir el sumatorio de las absorbancias de aquellos sustratos nitrogenados entre la absorbancia total a tiempo final del experimento y multiplicarlo por 100 (Sala *et al.* (2006). Se calcula tras los 8 días de incubación de los extractos de los suelos en las microplacas.

$$NUSE = (\Sigma \text{Abs aminoácidos+aminas}) / (\Sigma \text{Abs total}) \times 100$$

Velocidad de metabolización de cada sustrato (VMS) o pendiente de la curva resultante de representar el consumo de cada sustrato frente al tiempo.

2.6.5. Estimación de la diversidad microbiana mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

La extracción del ADN se realizó con el PowerSoil® DNA Isolation kit (Mo-Bio Laboratories, California, Estados Unidos), cuyo producto se guardó a -20°C a la espera de cuantificar el material genético. Para comprobar la integridad del genoma, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tampón TAE 1x y se dejó migrar a 100 mV durante 40 minutos hasta teñir con bromuro de etidio durante 15-20 minutos. Una vez garantizada la integridad del ADN se comenzó con las ampliificaciones.

2.6.5.1. Amplificación del 16S/18S

En la primera PCR se amplificó prácticamente la totalidad de los genes 16S de bacterias y arqueas, así como el 18S de los hongos. Para este último grupo de organismos se eligió la secuencia de la SSU rDNA en lugar de las secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer), ya que la amplificación de estos fragmentos conlleva un sesgo a nivel de división a la hora de la amplificación (Bellemain *et al.*, 2010). Esta primera reacción se hace con pares de cebadores específicos para asegurar la amplificación del organismo de interés. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

2. Materiales y métodos

16S bacteriano (Lane, 1991, Weisburg *et al.*, 1991)

27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Los parámetros de PCR utilizados fueron: una desnaturalización inicial (5 minutos, 94°C), seguida por 25 ciclos de desnaturalización (1 minuto, 94°C), anillamiento (1 minuto, 55°C) y elongación (2 minutos, 72°C) y una elongación final (10 minutos, 72°C). El amplicón generado fue de 1465 pb.

18S fúngico (Vainio & Hantula, 2000)

NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'
FR1 5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3'

Los parámetros de PCR utilizados fueron: una desnaturalización inicial (8 minutos, 95°C), seguida por 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos, 95°C), anillamiento (45 segundos, 47°C) y elongación (3 minutos, 72°C) y una elongación final (10 minutos, 72°C). El amplicón generado fue de 1650 pb.

Las reacciones de PCR de hongos y bacterias se realizaron con el kit PCR Master Mix de Promega para un volumen final de 25 µL y las siguientes concentraciones finales: PCR Master Mix 1x, cebador 5'-3' 1 µM, cebador 3'-5' 1 µM y 2 µL de DNA genómico.

16S arqueano (Weisburg *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 2001)

622F 5'-TGAAATCYRATAATCCC-3'
958R 5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'

Los parámetros de PCR utilizados fueron: una desnaturalización inicial (5 minutos, 94°C), seguida por 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto, 94°C), anillamiento (1 minuto, 46°C) y elongación (2 minutos, 72°C) y una elongación final (10 minutos, 72°C). El amplicón generado fue de 336 pb.

Las reacciones de PCR de arqueas se realizaron con la AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) para un volumen final de 50 µL y las siguientes concentraciones finales: Reaction Buffer 1x, MgCl₂ 3 µM, dNTPs 1 µM cebador 5'-3' 0,2 µM, cebador 3'-5' 0,2 µM, 0,5 µL de Taq polimerasa y 0,5 µL de DNA genómico.

2.6.5.2. Reacción de PCR anidada

El amplicón generado durante primera PCR se empleó como molde para la PCR anidada. El objetivo de esta técnica es acoplar una secuencia rica en GCs al nuevo amplicón para retenerlo en el gel desnaturizante y disminuir su tamaño para que pueda resolverse. Las condiciones para este paso fueron las siguientes:

16S bacteriano (Brosius *et al.*, 1981)

907R 5'-CCGTCAATTCMTTGTAGTTT-3'
341F-GC 5'-GCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCCGCCCC
CGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Los parámetros de PCR utilizados fueron: una desnaturalización inicial (10 minutos, 94°C), seguida por 35 ciclos de desnaturalización (1 minuto, 94°C), anillamiento (1 minuto, 52°C) y elongación (2 minutos, 72°C) y una elongación final (10 minutos, 72°C). El amplicón generado fue de 566 pb.

18S fúngico (Kim *et al.*, 2009)

NS3 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGG
GGCACGGGGGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGC
C-3'
YM951R 5'-TTGGCAAATGCTTTTCGC-3'

Se realizó una Touchdown PCR que consistió en una desnaturalización inicial (10 minutos, 95°C), seguida por 31 ciclos de desnaturalización (1 minuto, 93°C), anillamiento (1 minuto, partiendo de 55°C y bajando cada ciclo 0,3°C hasta llegar a 46°C) y elongación (3 minutos, 72°C) y una elongación final (5 minutos, 72°C). El amplicón generado fue de 398 pb.

Las reacciones de PCR de hongos y bacterias se realizaron con el kit PCR Master Mix de Promega para un volumen final de 100 µL y las siguientes concentraciones finales: PCR Master Mix 1x, cebador 5'-3' 1 µM, cebador 3'-5' 1 µM y 3 µL de DNA molde.

16S arqueano (Weisburg *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 2001)

622F-GC 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCCGCC
CCGCCCTGAAATCYRATAATCCC-3'
958R 5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'

Los parámetros de PCR utilizados fueron: una desnaturalización inicial (5 minutos, 94°C), seguida por 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto, 94°C), anillamiento (1 minuto, 46°C) y elongación (2 minutos,

72 °C) y una elongación final (10 minutos, 72 °C). El amplicón generado fue de 336 pb.

Las reacciones de PCR de arqueas se realizaron con la AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) para un volumen final de 100 µL y las siguientes concentraciones finales: Reaction Buffer 1x, MgCl₂ 3 µM, dNTPs 0,5 µM cebador 5'-3' 0,1 µM, cebador 3'-5' 0,1 µM, 0,5 µL de Taq polimerasa y 1 µL de DNA molde.

2.6.5.3. Purificación del producto de la amplificación y resolución de las bandas en gel desnaturalizante

Todos los productos de PCR resultantes se purificaron mediante el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y se concentraron mediante un rotavapor, para posteriormente añadir el tampón de carga (composición incluida en el Anexo II) y correr el gel a 200V durante 4 horas a 60°C. Los geles de DGGE se prepararon con gradientes de 30-70% de urea-formamida para bacterias, de 20-50% para hongos y de 35-70% para arqueas. Por último, fueron teñidos con bromuro de etidio durante 20 minutos y lavados en agua ultrapura durante 10 minutos.

2.6.5.4. Recuento del número de especies y estimación indirecta de la biomasa microbiana

Una vez obtenidos los geles, se calculó la distancia a la que había migrado cada una de las bandas de DNA desnaturalizado con respecto al origen para poder discriminar las diferentes especies (a igual distancia al origen, misma especie) y comparar los distintos cultivos en base a las especies que comparten, así como la estimación de su biomasa microbiana, que se encuentra correlacionada con la intensidad de la banda. Para estos cálculos se emplearon los softwares GeneTools (GeneSys, California, Estados Unidos) e Image J (National Institute of Health).

Para evaluar la similitud específica que presentaban los cultivos entre sí, se realizó un escalamiento multidimensional, previa elaboración de una matriz con los valores de intensidad, gracias al software libre PAST y empleando la medida de similitud de Bray-Curtis. La abundancia de bacterias, hongos y arqueas se calculó mediante el promedio de las intensidades de banda de cada uno de los tratamientos.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el software PASW Statistics v.18 (IBM, Nueva York, Estados Unidos). Para comprobar las diferencias entre los distintos grupos de tratamientos se empleó el test paramétrico del análisis de la varianza o ANOVA, de una vía si existía un único factor, y de dos vías, para comparar el efecto de varios factores, tanto de forma conjunta como separada. Como test *post hoc* se utilizó el S-N-K, si se cumplía la homogeneidad de varianzas y el C de Dunnett, si no lo hacía.

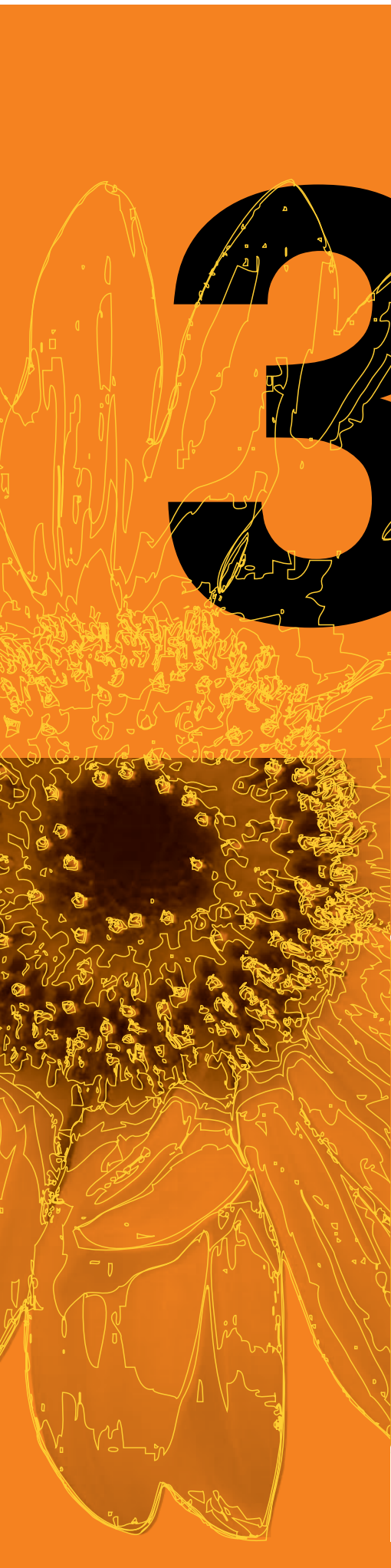
El empleo de la ANOVA exige una comprobación previa de la distribución normal de las muestras mediante el test del Kolmogorov-Smirnov y de la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. En los casos de un solo factor en los que no fue posible aplicar este test paramétrico por incumplir estas premisas, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y para diferenciar entre tratamientos, el test de la U de Mann-Whitney. Además, se empleó el test de la T de Student para comparar las diferencias observadas entre dos fertilizantes y/o tipos de sustrato. Para todos los casos, se determinó que existía significancia estadística para valores de $\alpha \leq 0,05$.

Para calcular la diversidad y la similitud entre comunidades microbianas se empleó el software Primer7, con el que se calcularon los índices de diversidad de Shannon-Weaver y Simpson y se realizaron los dendrogramas y los escalamientos multidimensionales, a través de la transformación previa de los datos.



Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

3



3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

Para la valoración de la fitotoxicidad del té de compost se realizaron bioensayos de germinación con semillas de rábano y guisante, en los que se determinó el efecto de la aplicación de diferentes dosis del TCA, así como de diferentes inóculos bacterianos de las especies que lo componen, consideradas más abundantes y representativas.

La caracterización de su potencialidad como herramienta de mejora de la nutrición de las plantas se basó en la evaluación de la capacidad de las diferentes cepas microbianas para la fijación biológica de nitrógeno, así como de la capacidad solubilizadora de fosfatos y de potasio.

Con respecto a la valoración de su efectividad, se comparó, en condiciones controladas, el efecto de la adición del TCA al sustrato de crecimiento de la planta con el que tiene una fertilización convencional, tanto a nivel de crecimiento de la planta como de características químicas y biológicas del sustrato.

3.1. BIOENSAYOS DE GERMINACIÓN

A través de la prueba de germinación en placa Petri se evaluó el efecto de la aplicación del bioinsumo, a diferentes dosis, sobre el Índice de Germinación (IG), la longitud de la radícula y la longitud del hipocótilo, comparándolo con un testigo (Agua). De las tres dosis evaluadas, sin diluir (TCA puro), diluido 5 veces (TCA 1/5) y diluido 10 veces (TCA 1/10), las que promovieron un mayor crecimiento tanto de la parte aérea, como de la raíz, así como un mayor porcentaje de germinación fueron las diluciones 1/5 y 1/10, tanto en planta

de rábano (Tabla 3.1A), como de guisante (Tabla 3.1B), obteniéndose los mejores resultados en rábano con la dilución 1/10 y en guisante con la dilución 1/5. La aplicación del producto puro presentó estadísticamente el mismo efecto que la aplicación de agua desionizada en ambas especies vegetales.

En el caso del bioensayo de germinación tras la aplicación de 15 mL de inóculo bacteriano en solución salina isotónica (concentración de $7,8 \cdot 10^6$ bacterias/mL) de las 12 especies microbianas más relevantes del TCA se pudo observar que, en rábano, *Pseudomonas putida*, promovió los mayores desarrollos de la parte aérea, mientras que *Serratia marcescens* promovió un mayor desarrollo radicular. El mayor porcentaje de germinación relativo fue promovido por *S. marcescens* y *Bacillus licheniformis* y los mayores porcentajes de crecimiento de radícula e índice de germinación correspondieron a *S. marcescens* y *R. glutinosa* (Tabla 3.2A). En cuanto al guisante, el mayor desarrollo de la parte aérea se obtuvo tras la aplicación de inóculo de *Ochrobactrum tritici* y *P. putida* y el de la parte radical, con *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*. El mayor porcentaje de germinación relativo se obtuvo con la inoculación con *Bacillus subtilis*, *Gordonia terrae* y *O. tritici*, pero el mejor índice de germinación fue obtenido tras la inoculación con *B. safensis* (Tabla 3.2B).

3.2. CAPACIDAD FIJADORA Y SOLUBILIZADORA EN CULTIVO PURO

De las 12 especies evaluadas, solo una, *G. terrae* fue incapaz de crecer en alguno de los tres medios especí-

Tabla 3.1. Bioensayo de germinación en rábano (A) y guisante (B) en agua y en diferentes diluciones del TCA: sin diluir (puro), diluido 5 veces (1/5) y diluido 10 veces (1/10). PGR=Porcentaje de germinación relativo, CRR=Crecimiento de la radícula relativo e IG=Índice de germinación. Los asteriscos indican los mayores valores según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=30.

(A) Rábano	Long. Parte aérea	Long. Raíz	PGR (%)	CRR (%)	IG
Agua	1,58 ± 0,29	2,20 ± 0,47	—	—	—
TCA Puro	2,27 ± 0,42	2,30 ± 0,38	127,78 ± 5,55	136,36 ± 18,07	204,33 ± 27,87
TCA 1/5	3,77 ± 0,46*	4,87 ± 0,77*	155,56 ± 5,55*	237,34 ± 35,50*	369,26 ± 55,13*
TCA 1/10	4,75 ± 0,39*	5,88 ± 0,65*	155,56 ± 5,56*	286,53 ± 28,55*	448,06 ± 45,37*

(B) Guisante	Long. Parte aérea	Long. Raíz	PGR (%)	CRR (%)	IG
Agua	1,70 ± 0,30	1,12 ± 0,21	—	—	—
Puro	2,43 ± 0,43	2,18 ± 0,38	146,67 ± 17,64	265,83 ± 35,67	403,81 ± 56,99
1/5	4,73 ± 0,42*	7,97 ± 0,70*	193,33 ± 6,67*	735,84 ± 59,64*	1432,57 ± 120,43*
1/10	4,37 ± 0,60*	7,47 ± 0,80*	173,33 ± 13,33*	769,23 ± 61,13*	1337,91 ± 108,44*

Tabla 3.2. Bioensayo de germinación en rábano (A) y guisante (B) en agua y tras la inoculación con una dosis de 15 ml ($7,8 \cdot 10^6$ bacterias/mL) de las especies bacterianas procedentes del TCA. PGR=Porcentaje de germinación relativo, CRR=Crecimiento de la radícula relativo e IG=Índice de germinación. Los asteriscos indican los mayores valores según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=30.

(A) Rábano	Long. Parte aérea	Long. Raíz	PGR (%)	CRR (%)	IG
Agua	1,58 ± 0,29	2,20 ± 0,47	—	—	—
<i>Bacillus licheniformis</i>	2,67 ± 0,37	3,09 ± 0,48	144,50 ± 14,70*	162,06 ± 20,03	239,87 ± 33,80
<i>Bacillus pumilus</i>	2,57 ± 0,44	2,73 ± 0,55	105,57 ± 20,02	207,07 ± 27,15	233,97 ± 34,38
<i>Bacillus safensis</i>	3,09 ± 0,42	3,01 ± 0,49	122,23 ± 14,70	178,66 ± 23,97	227,10 ± 32,34
<i>Bacillus subtilis</i>	3,07 ± 0,30	2,63 ± 0,35	96,66 ± 3,33	128,25 ± 15,33	201,32 ± 23,70
<i>Bacillus velezensis</i>	3,30 ± 0,34	2,67 ± 0,38	90,00 ± 5,77	135,02 ± 17,43	206,38 ± 27,11
<i>Gordonia terrae</i>	3,30 ± 0,43	3,10 ± 0,58	138,87 ± 5,57	169,09 ± 28,54	235,97 ± 39,41
<i>Ochrobactrum tritici</i>	4,08 ± 0,52	3,42 ± 0,40	133,33 ± 9,61	194,13 ± 13,81	261,20 ± 18,74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,63 ± 0,28	1,65 ± 0,26	116,66 ± 19,25	98,02 ± 11,76	115,74 ± 14,45
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,27 ± 0,39	1,95 ± 0,38	111,13 ± 5,57	126,62 ± 20,55	141,99 ± 23,87
<i>Pseudomonas putida</i>	4,51 ± 0,71*	3,60 ± 0,46	122,23 ± 5,53	223,14 ± 12,54	273,95 ± 15,74
<i>Rhodotorula glutinosa</i>	4,25 ± 0,55	4,17 ± 0,44	138,87 ± 5,57	227,27 ± 13,29*	316,22 ± 18,95*
<i>Serratia marscescens</i>	3,82 ± 0,43	4,27 ± 0,59*	144,43 ± 5,57*	223,96 ± 26,16*	324,15 ± 38,12*

(B) Guisante	Long. Parte aérea	Long. Raíz	PGR (%)	CRR (%)	IG
Agua	1,7 ± 0,30	1,12 ± 0,21	—	—	—
<i>Bacillus licheniformis</i>	1,4 ± 0,31	1,35 ± 0,23	126,67 ± 13,33	172,19 ± 21,79	216,41 ± 29,75
<i>Bacillus pumilus</i>	2,08 ± 0,40	2,17 ± 0,50	133,33 ± 13,33	290,18 ± 56,05	338,66 ± 66,37
<i>Bacillus safensis</i>	2,90 ± 0,30	2,33 ± 0,27	193,33 ± 6,67	215,52 ± 23,87	417,49 ± 46,91*
<i>Bacillus subtilis</i>	1,57 ± 0,32	2,42 ± 0,43	166,67 ± 13,33*	258,93 ± 41,00	440,36 ± 69,78
<i>Bacillus velezensis</i>	1,27 ± 0,33	1,08 ± 0,26	113,33 ± 6,67	170,69 ± 29,96	198,53 ± 36,71
<i>Gordonia terrae</i>	1,75 ± 0,34	1,32 ± 0,19	166,67 ± 13,33*	141,07 ± 16,64	241,07 ± 29,84
<i>Ochrobactrum tritici</i>	3,99 ± 0,43*	2,39 ± 0,26	166,67 ± 6,67*	255,71 ± 17,02	430,93 ± 30,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,06 ± 0,29	1,32 ± 0,32	80,00 ± 11,55	295,39 ± 29,31	257,29 ± 34,30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,13 ± 0,31	2,78 ± 0,57*	113,33 ± 6,67	438,55 ± 57,71*	502,62 ± 67,61
<i>Pseudomonas putida</i>	3,59 ± 0,49*	2,72 ± 0,37*	153,33 ± 13,33	316,77 ± 27,34*	491,93 ± 42,81
<i>Rhodotorula glutinosa</i>	2,73 ± 0,47	2,24 ± 0,36	110,00 ± 26,46	300,00 ± 27,61	409,29 ± 38,54
<i>Serratia marscescens</i>	1,02 ± 0,32	0,76 ± 0,23	73,33 ± 6,67	185,06 ± 34,01	142,37 ± 28,62

ficos; las 11 restantes mostraron capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes para la planta, aunque dicha capacidad varió en función del nutriente (Tabla 3.3). Así, mientras que la mayoría presentaron elevada capacidad de solubilización de P y K, únicamente 5 mostraron capacidad para fijar nitrógeno (Figura 3.1), y de estas 5, las más destacadas fueron *O. tritici* y *S. marscescens*, con índices de fijación superiores a 2. *Ochrobactrum tritici*, además, mostró la capacidad solubilizadora de K más elevada (7,51), y un índice de solubilización de fosfato de los más altos (1,65); *S. marscescens* mostro un índice de solubilización de fosfatos similar (1,71) y uno de los índices de solubilización de K más elevados (5,65).

Las otras tres especies fijadoras de N, del género *Bacillus*, fueron *B. safensis* y *B. pumilus*, con índices alrededor de 1,40 y *B. subtilis* con 1,25. *B. safensis* es la especie de *Bacillus* con mayor capacidad de solubilizar K (6,14), seguida de *B. pumilus* (5,30), ambas con un índice de solubilización de P que ronda el 1,70. *B. subtilis*, aunque también tiene capacidad de solubilización, presenta índices más bajos (2,57 para el K y 1,28 para el P). Las otras dos especies de *Bacillus*, *B. licheniformis* y *B. velezensis*, presentan índices de solubilización de P de 1,71 y 1,51 respectivamente y no presentan halo indicativo de solubilización de K, por lo que su índice es 1,00; sin embargo, presentan un gran crecimiento, en extensión y densidad, sobre el medio de cultivo (Figura 3.2).

3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

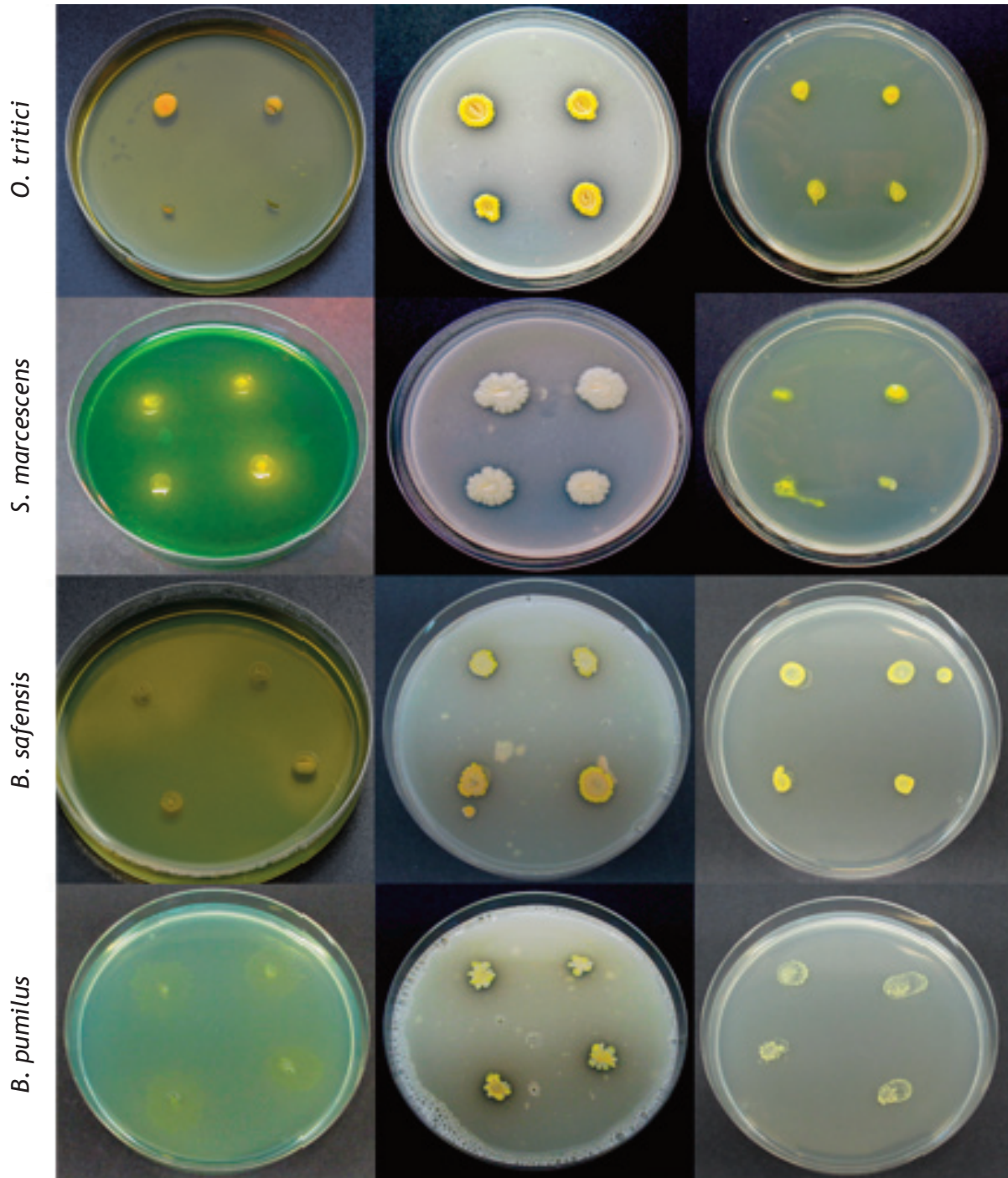


Figura 3.1. Crecimiento de *Ochrobactrum tritici*, *Serratia marcescens*, *Bacillus safensis* y *B. pumilus* en medios específicos NBF (izquierda), PKV (centro) y PKV modificado (derecha), en los que evidencia su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y solubilizar K.

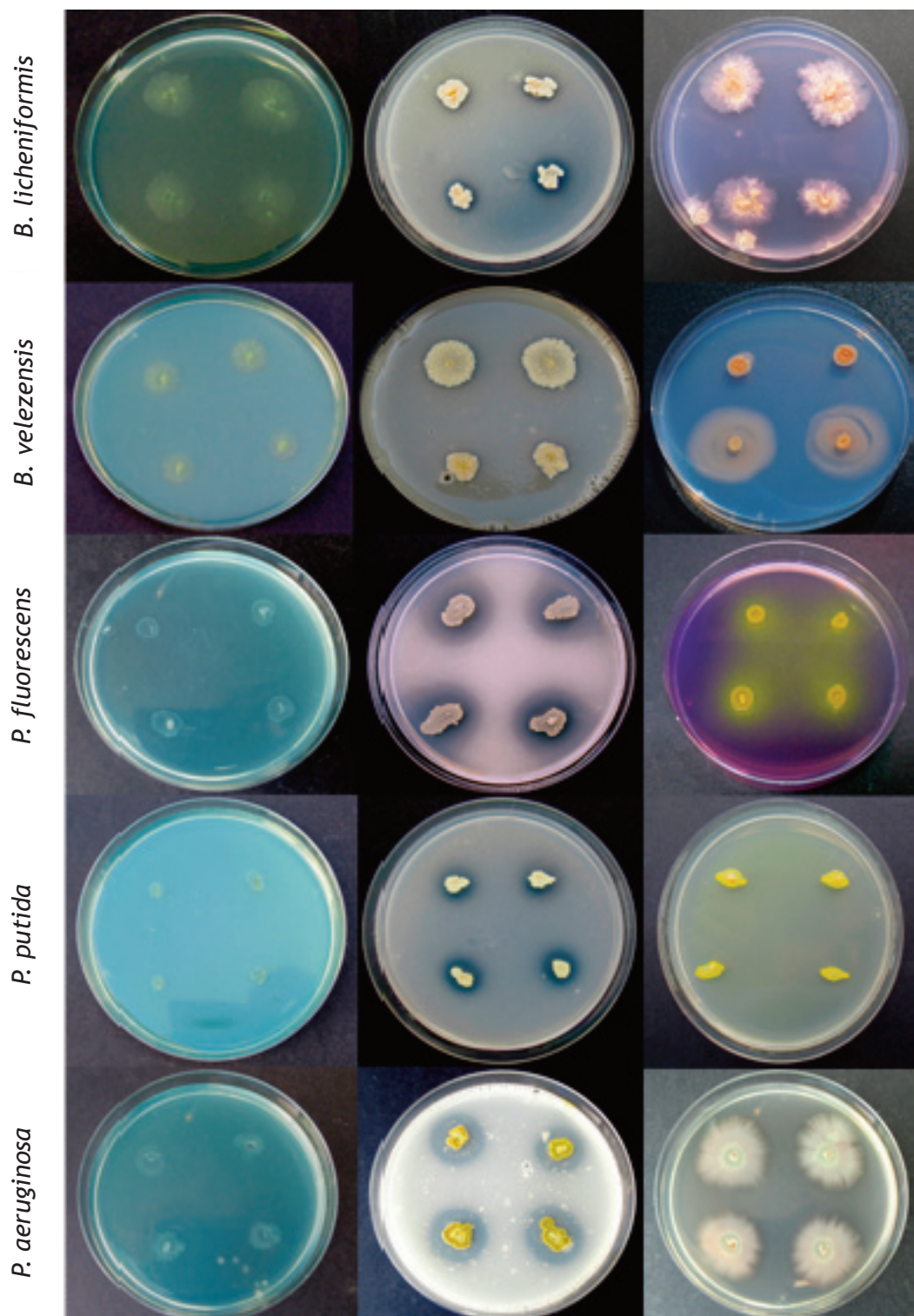


Figura 3.2. Crecimiento de *Bacillus licheniformis*, *B. velezensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* y *P. aeruginosa* en medios específicos NBF (izquierda), PKV (centro) y PKV modificado (derecha), en los que evidencia su elevada capacidad para fijar fosfatos y la no capacidad de fijar N, así como la capacidad de solubilizar K en el caso de *P. fluorescens* y *P. putida*.

3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

Tabla 3.3. Índice de fijación de N e Índices de solubilización de P y K obtenidos tras cultivar las cepas microbianas en placa Petri, durante 14 días, sobre medios de cultivo específicos: NBF (N), PKV (P) y PVK modificado (K). Los asteriscos indican los mayores valores según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=24.

	N	P	K
<i>Bacillus licheniformis</i>	1,00 ± 0,00	1,71 ± 0,04	1,00 ± 0,00
<i>Bacillus pumilus</i>	1,39 ± 0,06	1,66 ± 0,05	5,30 ± 0,19
<i>Bacillus safensis</i>	1,46 ± 0,04	1,76 ± 0,07	6,14 ± 0,25
<i>Bacillus subtilis</i>	1,25 ± 0,02	1,28 ± 0,03	2,57 ± 0,15
<i>Bacillus velezensis</i>	1,00 ± 0,00	1,51 ± 0,03	1,00 ± 0,00
<i>Gordonia terrae</i>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<i>Ochrobactrum tritici</i>	2,21 ± 0,12*	1,65 ± 0,06	7,51 ± 0,28*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00 ± 0,00	2,36 ± 0,11	1,00 ± 0,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,00 ± 0,00	3,44 ± 0,13*	7,25 ± 0,26*
<i>Pseudomonas putida</i>	1,00 ± 0,00	1,85 ± 0,05	6,35 ± 0,24
<i>Rhodotorula glutinosa</i>	1,00 ± 0,00	1,44 ± 0,03	4,21 ± 0,14
<i>Serratia marcescens</i>	2,09 ± 0,05	1,71 ± 0,03	5,65 ± 0,27

Del resto de especies evaluadas cabe destacar a *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, por presentar la mayor capacidad de solubilización de fosfatos, con un índice de 3,44 y 2,36 respectivamente. *P. fluorescens* destaca además por tener, junto a *O. tritici*, la mayor capacidad de solubilizar K. La otra *Pseudomonas*, *P. putida* también se caracteriza por una elevada capacidad de solubilización de K y por ser capaz de solubilizar P, aunque en menor medida que las dos anteriores.

Finalmente, la levadura *Rhodotorula glutinosa* también se muestra como una especie de gran interés aplicado por su capacidad de solubilizar K (4,21) y P (1,44).

3.3. EFECTIVIDAD DEL BIOINSUMO

Para valorar la efectividad del bioinsUMO se establecieron 3 dosis de aplicación: sin diluir (TCA puro), diluido 5 veces (TCA 1/5) y diluido 10 veces (TCA 1/10), comparándolas con una fertilización con NPK (7-5-6) de Flower (Convencional) y una no fertilización (Agua). Los diferentes tratamientos se aplicaron directamente al sustrato de crecimiento de plantas de girasol, una vez cada 15 días, durante las 12 semanas de crecimiento en condiciones controladas, comparándose el efecto obtenido en suelo y en turba.

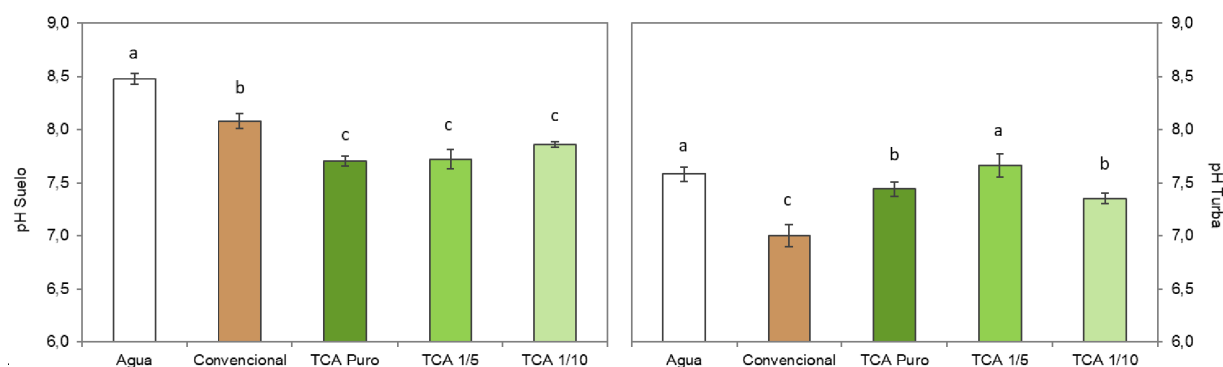


Figura 3.3. Valores de pH de los sustratos suelo (izquierda) y turba (derecha) en los que las plantas de girasol crecieron en invernadero durante 12 semanas, bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional o TCA a diferentes dosis. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc* de la ANOVA. Tamaño muestral n=5.

3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

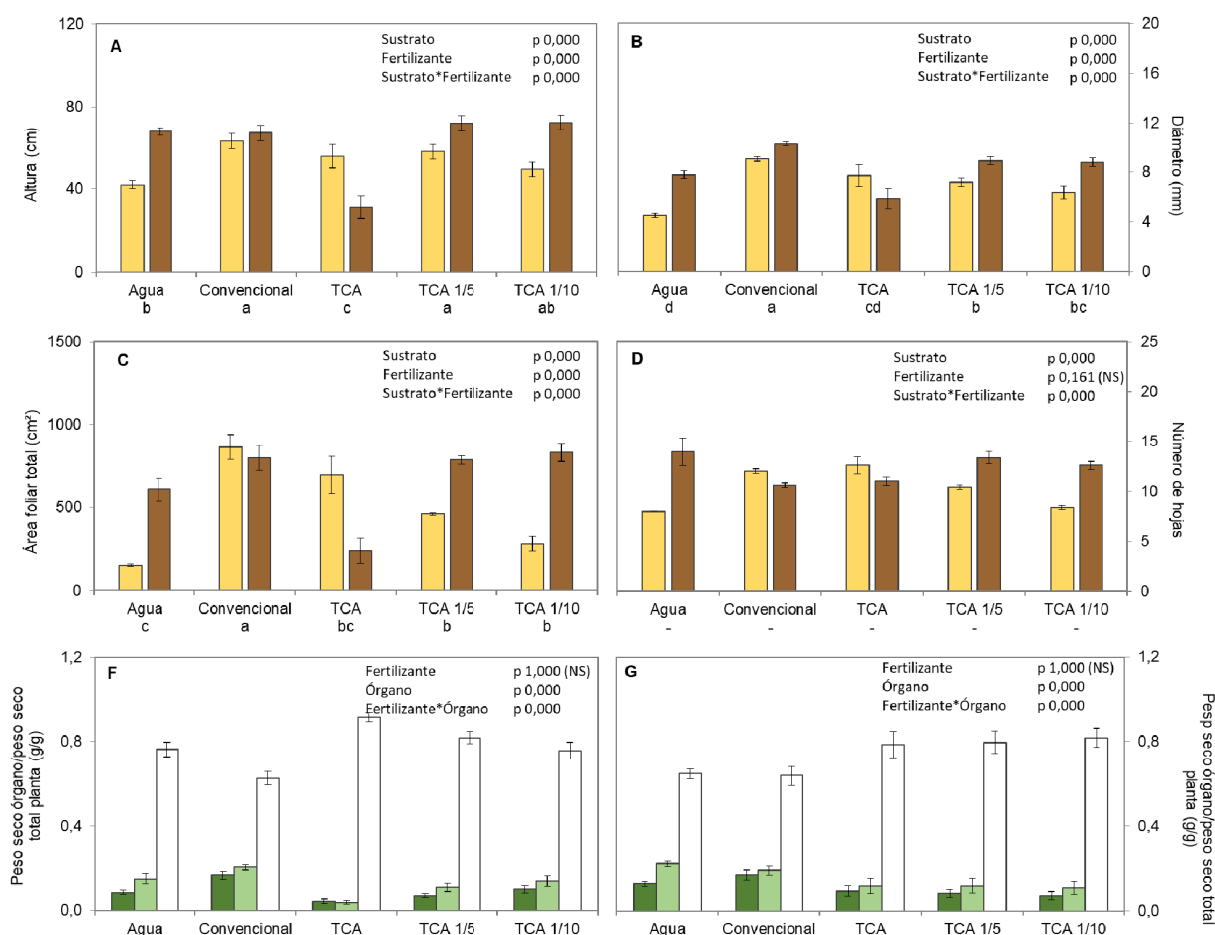


Figura 3.4. Valores de A) altura (cm), B) diámetro del tallo a nivel de cuello de raíz (mm), C) área foliar total (cm²) D) número de hojas en ■ suelo y ■ turba y proporción con respecto al total de la planta, en peso seco, de □ raíz, ■ tallo y ■ hojas de plantas de girasol crecidas, durante 12 semanas, en turba (F) y en suelo (G) bajo diferentes tipos de fertilización: agua, convencional y té de compost a diferentes dosis (TCA, TCA 1/5 y TCA 1/10). Tamaño muestral n=5.

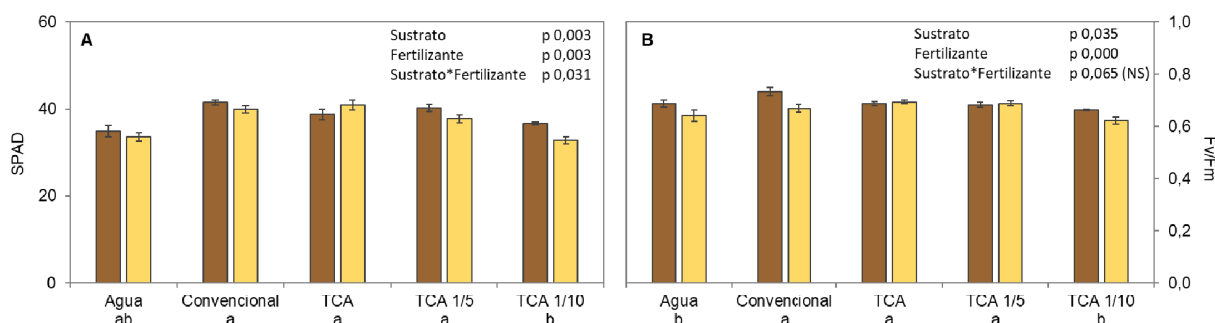


Figura 3.5. Cuantificación indirecta de A) la concentración de clorofila y B) el rendimiento cuántico del PSII de girasoles crecidos en ■ suelo y ■ turba con diferentes tipos de fertilización: agua, fertilizante convencional, TCA, TCA 1/5 y TCA 1/10. Tamaño muestral n=10.

3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

Tabla 3.4. Número de especies de cada taxón e índice de Shannon en suelo (S) y turba (T) en el que han crecido plantas de girasol, durante 12 semanas, bajo diferentes regímenes de fertilización: solo agua, convencional, y diferentes dosis de té de compost o insumo (A: agua, C: Convencional; I: TCA puro, I 1/5: TCA diluido 1/5). Tamaño muestral n=3.

Muestra	Hongos	Bacterias	Arqueas	Total spp.	H' (Shannon)
SA	11	13	0	24	3,008
SC	12	13	0	25	3,109
SI	12	13	0	26	3,108
SI_1/5	13	13	0	25	3,081
TA	5	16	2	23	3,056
TC	7	7	7	21	2,625
TI	7	13	7	29	3,142
TI_1/5	11	13	8	32	3,181

3.3.1. Características físico-químicas del sustrato

A la finalización del experimento el pH de los sustratos varió significativamente en función del tratamiento de fertilización, tanto en suelo como en turba (Figura 3.3). En suelo, el que solo recibió agua (8,48) mostró el valor más alto, seguido del fertilizado de forma convencional (8,08) siendo significativamente más bajo el pH de los tratados con TCA (7,7-7,8), sin diferencias en función de la dosis aplicada. Sin embargo, en turba, el pH más bajo fue el de la fertilización convencional (7,00) y los más altos el del TCA diluido 1/5 (7,7) y el del tratamiento solo con agua (7,58); la aplicación del TCA no diluido y la del diluido 1/10 presentaron un valor intermedio (7,4).

3.3.2. Crecimiento de la planta

La caracterización biométrica de las plantas de girasol, en base a la altura, diámetro del tallo a nivel de cuello de raíz, número de hojas, área foliar total y peso fresco (Figuras 3.4A-D), mostró la existencia de diferencias en función del tipo de sustrato, significativamente mayor en turba que en suelo, así como del tipo de fertilización. En ambos sustratos la fertilización produjo un incremento de los valores en todos los parámetros, aunque el porcentaje de mejora varió entre tratamientos.

La mayor altura se alcanzó en aquellos girasoles crecidos en turba con TCA 1/5 y en suelo con fertilizante convencional y los mayores calibres del tallo los presentaron girasoles fertilizados de forma convencional, tanto en turba como en suelo. Por otra parte, la mayor área foliar en turba perteneció a los girasoles crecidos con TCA 1/10 y en suelo a aquellos crecidos con fertilizante convencional, y finalmente, el promedio del nú-

mero de hojas osciló entre 8 en suelo regado con agua y 14 en turba y regada con agua. A raíz de estos resultados se observó que la aplicación de TCA diluido 1/5 y 1/10 provocó respuestas similares en planta, cosa que no ocurrió entre el TCA puro y el diluido cinco veces.

A la hora de estudiar la biomasa vegetal (Figuras 3.4F y G), el análisis estadístico reveló que el fertilizante por sí sólo no explicaba las diferencias observadas entre los tratamientos, sino que los resultados observados eran una combinación entre el órgano estudiado y el tipo de fertilización. La biomasa foliar fue mayor bajo el riego con fertilizante convencional, tanto en turba como en suelo; la biomasa del tallo fue mayor con fertilización convencional en turba y bajo riego con agua en suelo y la biomasa radical fue mayor bajo riego con TCA en turba y con TCA 1/10 en suelo.

Tanto en suelo como en turba, los mayores valores de SPAD y de rendimiento cuántico del fotosistema II se encontraron bajo las fertilizaciones convencional y TCA sin diluir. Los valores del SPAD en turba oscilaron entre 41,4 de la fertilización convencional y 34,9 del riego con agua, en cambio en suelo, el mayor valor fue de 40,8 del riego con TCA y el menor valor de 32,8 del riego con TCA 1/10 (Figura 3.5A). En cuanto a la eficiencia fotoquímica, el parámetro Fv/Fm se mantuvo en un rango pequeño, que osciló entre 0,733 de los girasoles crecidos en turba y fertilizados de forma convencional y 0,623 de los girasoles crecidos en suelo fertilizados con TCA 1/10 (Figura 3.5B).

3.3.3. Riqueza específica de la microbiota del suelo

La realización de geles de DGGE permitió establecer la riqueza específica en cada sustrato analizado, así como

la diversidad, que, como se puede observar en la figura 3.6, se encuentra agrupada en tres grandes grupos, a saber, Arqueas, Bacterias y Hongos, y la proporción que supone cada uno de ellos en la comunidad.

La riqueza específica promedio de todos los tratamientos fue de $25,37 \pm 1,14$, siendo la proporción de bacterias igual o superior a la de hongos en prácticamente todos los sustratos. Es de destacar la presencia de Ar-

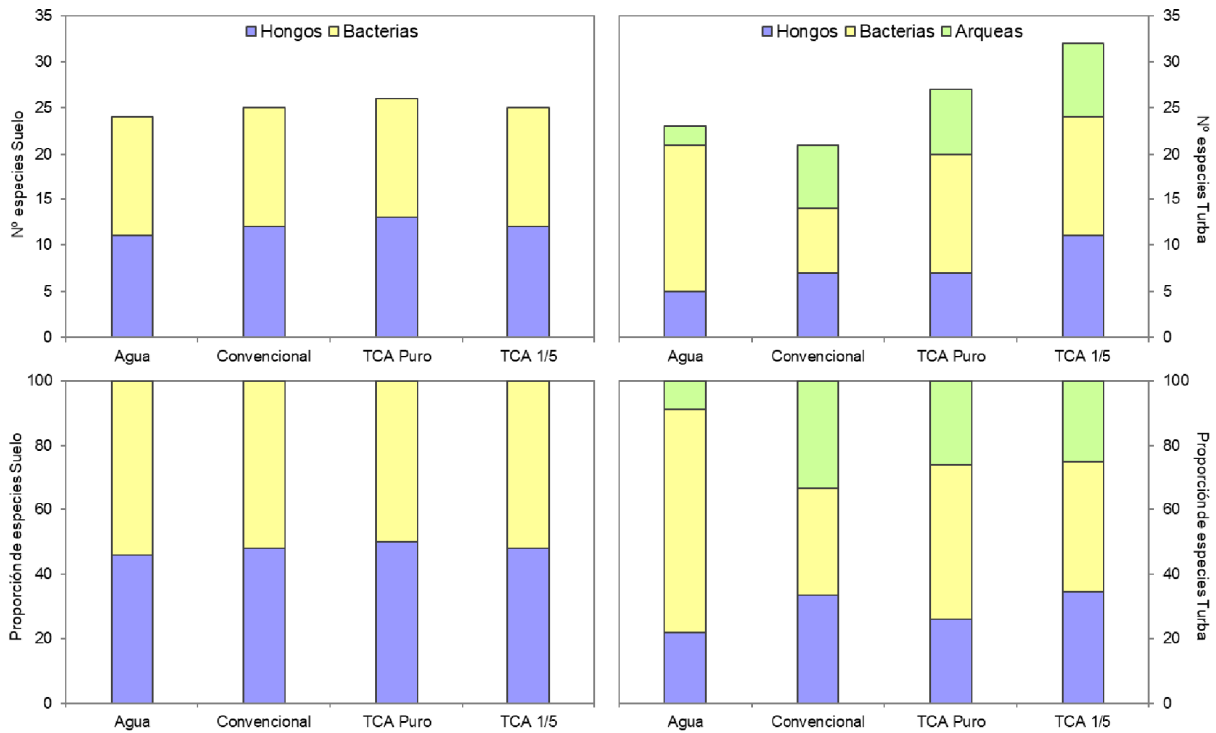


Figura 3.6. Número de especies y proporción de los diferentes grupos taxonómicos (fúngico, bacteriano y arqueano) encontrados en los suelos (izquierda) y la turba (derecha) en la que crecieron las plantas de girasol, durante 12 semanas, bajo diferente fertilización: solo agua, convencional y té de compost a diferentes dosis (TCA no diluido y TCA 1/5). La dosis TCA 1/10 no aparece por no diferir de la 1/5. Tamaño muestral n=3.

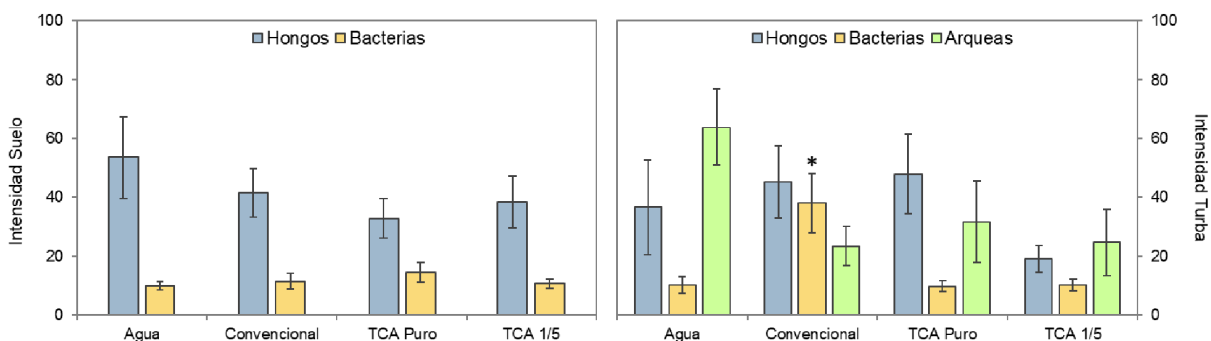


Figura 3.7. Semi-cuantificación de la abundancia microbiana en suelo (izquierda) y turba (derecha) en el que han crecido plantas de girasol, durante 12 semanas, bajo diferentes regímenes de fertilización: solo agua, convencional y té de compost a diferentes dosis (TCA no diluido, y TCA diluido 1/5). La dosis TCA 1/10 no aparece por no diferir de la 1/5. Tamaño muestral n=3.

3. Evaluación de la fitotoxicidad y efectividad del TCA

queas únicamente en turba, observándose que el número se incrementa con la fertilización, ya sea convencional o con TCA.; también se observa un incremento en el número de hongos, siendo el TCA diluido 1/5 el que presenta mayor incremento. Sin embargo, en el caso de las bacterias se produce una reducción del número, siendo mucho mayor en el caso del convencional que en el té de compost. De todos los tratamientos, fue la aplicación de TCA 1/5 la que mostró la distribución de taxones más proporcionada.

Esta técnica, permitió, además, realizar una semi-cuantificación de la abundancia de cada taxón comparando la intensidad de las bandas del gel de DGGE. A mayor intensidad de la banda, mayor concentración de DNA y, por lo tanto, mayor biomasa de esa especie en el sustrato del cultivo. En la figura 3.7 se encuentran representados los diagramas de intensidades para cada taxón. En ella, se puede observar cómo la biomasa fúngica fue mayor en todos los tratamientos del suelo, sin embargo, en turba, la biomasa microbiana se encontró

representada mayoritariamente por hongos y arqueas. El análisis de la varianza únicamente reflejó diferencias significativas en la turba regada con fertilizante convencional, donde la biomasa bacteriana fue muy superior a la del resto de tratamientos, no encontrándose diferencias en los otros taxones en función del tipo de fertilización.

Simultáneamente, se calcularon los índices de diversidad de Shannon para los diferentes tratamientos. El índice de Shannon-Weaver se basa en la teoría de la uniformidad y mide la incertidumbre asociada a conocer la especie de un individuo extraído al azar de una comunidad. Este parámetro adquiere valores de 0 a 5: si el valor es cercano a 0, indica que hay dominancia de una especie en la comunidad, por lo que no hay incertidumbre. Este parámetro ha sido calculado en función de los dos anteriores, es decir, del número de especies y de la representatividad en biomasa de cada una de ellas. Los valores obtenidos fluctuaron entre 2,62 y 3,18 coincidiendo con los tratamientos con

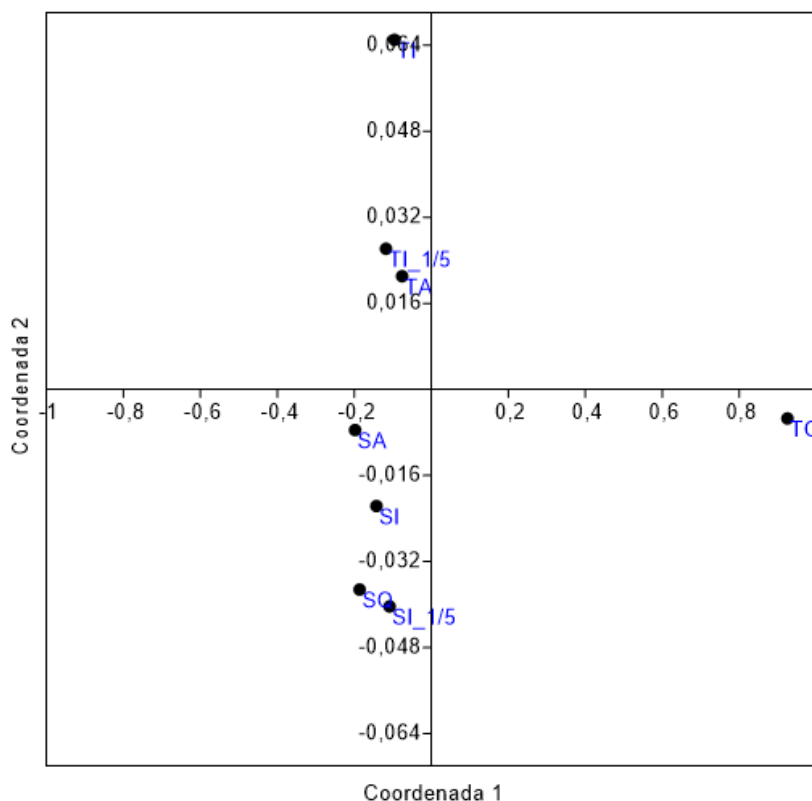


Figura 3.8. SMDS obtenido tras el análisis de toda la comunidad microbiana de los sustratos suelo (S) y turba (T), en los que crecieron plantas de girasol bajo diferentes regímenes de fertilización: solo agua (A), convencional (C) y té de compost no diluido (I) y diluido 5 veces (I 1/5).

menor y mayor riqueza específica respectivamente, es decir, la más baja en el caso de la fertilización convencional en turba y la más alta en el de la turba con aplicación de TCA diluido 1/5 (Tabla 3.4).

Por último, se realizó un análisis de similitud de la comunidad microbiana de los distintos sustratos utilizados. Con los datos de los tres taxones de todos los sustratos unificados, el análisis de escalamiento multidimensional distinguió tres grupos en función de las especies mi-

crobianas que compartían. El primer grupo quedó conformado por un único cultivo, la turba regada con fertilizante convencional (TC), claramente diferenciado de los demás sustratos; el segundo grupo quedó compuesto por todos los tratamientos del sustrato suelo: riego con agua (SA), con fertilizante convencional (SC), con TCA sin diluir (SI) y diluido 1/5 (SI 1/5); el tercero lo formaron los cultivos de turba regada con agua (TA), con té de compost sin diluir (TI) y diluido 1/5 (TI 1/5) (Figura 3.8).



Diagnosis de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato



4. Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

La evaluación de la efectividad del té de compost en invernadero, bajo condiciones controladas, se ha llevado a cabo desde dos aproximaciones diferentes. Por un lado, se ha evaluado el efecto, tanto en la actividad metabólica del suelo como en el crecimiento de las plantas de pimiento, en función del sustrato utilizado como soporte del cultivo: turba, suelo y turba enmendada con Insumo Agrícola Sólido (IAS); por otro lado, se ha evaluado el efecto en el crecimiento y la morfohistología de la planta cuando la turba utilizada como soporte del cultivo ha sido previamente esterilizada.

4.1. EFECTIVIDAD SEGÚN EL TIPO DE SUSTRATO

4.1.1. Características físico-químicas del sustrato

Los valores de pH obtenidos rondaron el 8 en todos los sustratos (Figura 4.1A), encontrándose el mayor valor

en suelo con fertilización convencional (8,7) y el menor en turba con fertilización convencional (7,6). El análisis estadístico señaló que tanto el tipo de fertilizante como el sustrato usado influyeron en el pH, siendo el suelo el sustrato que mostró el valor más alto y la turba el más bajo; además, la fertilización convencional y con TCA propiciaban un pH ligeramente superior que el riego con agua.

La conductividad eléctrica (CE) también se vio influenciada por el tipo de sustrato, pero no así por el tipo de fertilizante (Figura 4.1B). El sustrato que presentó mayor conductividad eléctrica fue el IAS (693,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para el agua, 633,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para el fertilizante convencional y 714,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para TCA), mientras que el suelo y la turba se mantuvieron en un rango de entre 91,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ del suelo regado con agua y 255,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$, de la turba fertilizada con TCA.

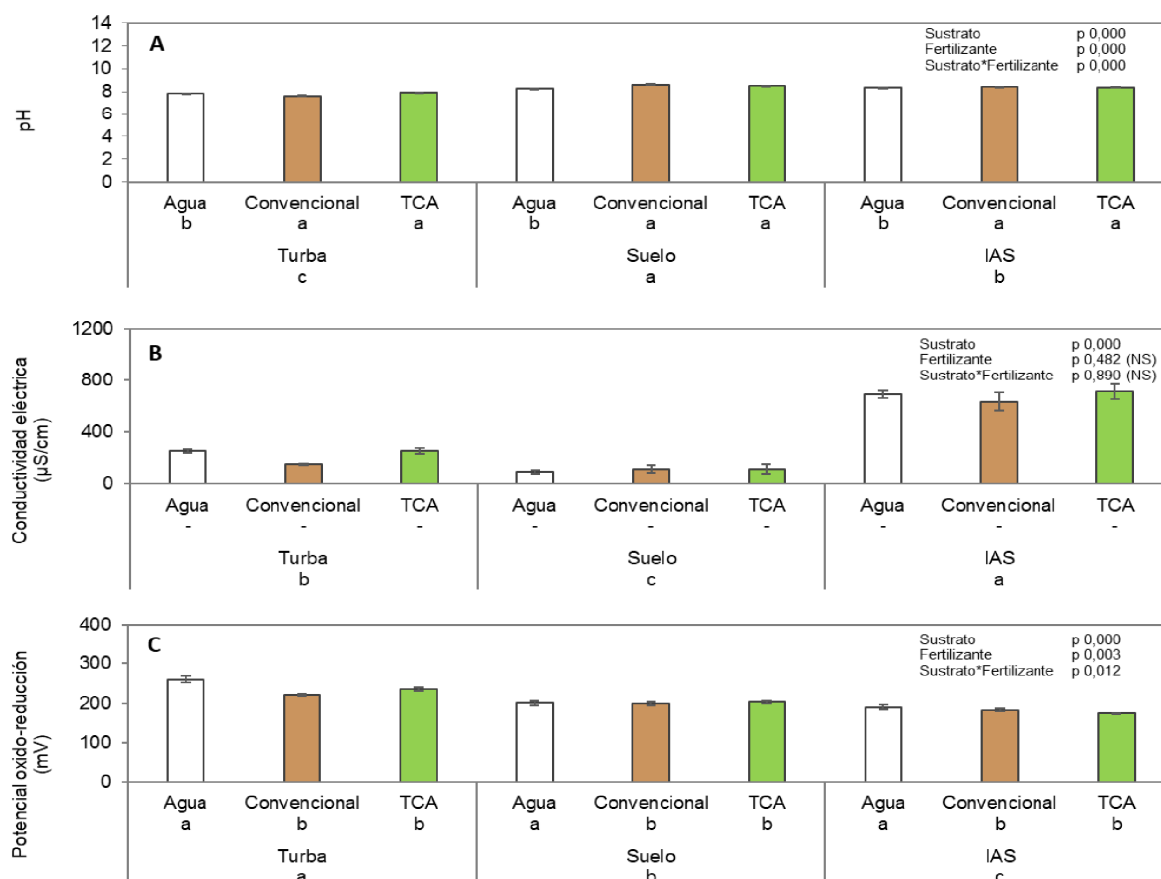


Figura 4.1. Valores de pH (A), conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (B) y potencial de óxido reducción (mV) (C), para cada uno de los sustratos (Turba, Suelo e IAS) en los que las plantas de pimiento crecieron durante 12 semanas en invernadero bajo diferente régimen de fertilización: agua, convencional o TCA. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis post hoc de la ANOVA. Tamaño muestral n=3.

Por otra parte, con respecto al potencial de oxido-reducción (Eh), el análisis estadístico señaló que tanto el tipo de fertilización como de sustrato condicionaban el resultado (Figura 4.1C). El sustrato que proporcionó los valores más altos fue la turba (260,3 mV sólo agua; 220,7 mV fertilización convencional; 235,7 mV TCA), seguida por el suelo (201,0 mV; 198,4 mV; 202,9 mV) y en último lugar el IAS (189,8 mV; 182,1 mV; 173,7 mV). Contrariamente a lo que sucede con el pH, es el riego con agua el que favorece los valores más altos, en comparación con ambos tipos de fertilización.

4.1.2. Actividad metabólica del sustrato

En el caso de las actividades enzimáticas, se observó que había diferencias entre las combinaciones de sustrato y tipo de fertilización. Así, en turba (Figura 4.2A), la actividad principal del suelo vino representada por la Fosfatasa Ácida, encontrándose además que bajo riego con agua y con TCA la actividad β -Glucosaminidasa, Ureasa y Arilsulfatasa se vio favorecida, mientras que bajo fertilización convencional fue la actividad

Arilsulfatasa la que primaba sobre la oxidación de compuestos de nitrógeno y carbono. En suelo (Figura 4.2B), sustrato en el que se encontró la menor actividad enzimática, los tres tipos de riego indujeron principalmente la actividad de las dos Fosfatasas y la Arilsulfatasa, seguidas por la Ureasa, la Deshidrogenasa y finalmente la β -Glucosaminidasa. Por último, es en el suelo enmendado con IAS en el que se detectaron los niveles más altos de actividad enzimática (Figura 4.2C), encontrándose un claro predominio de ambas Fosfatasas, seguidas por la Ureasa, la Arilsulfatasa, la β -Glucosaminidasa y la Deshidrogenasa.

El análisis de la varianza mostró que las mayores diferencias en actividad radicaban en el tipo de sustrato donde habían sido cultivados los pimientos, presentándose los valores significativamente mayores en el suelo enmendado con IAS. Por otra parte, se pudo observar cómo la fertilización convencional influía positivamente en la actividad deshidrogenasa y la ausencia de nutrición, en la actividad β -Glucosaminidasa (Tabla 4.1).

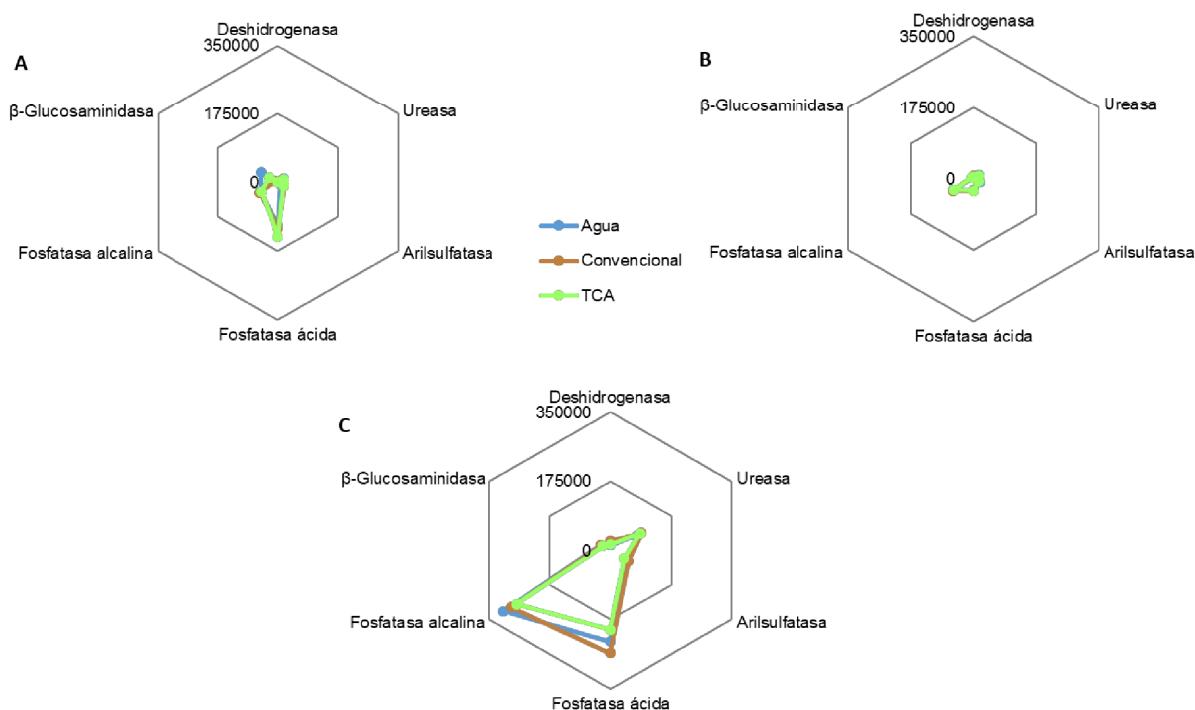


Figura 4.2. Actividad, medida en mg de sustrato · kg suelo seco⁻¹ · h⁻¹, de 6 enzimas microbianas, en turba (A), suelo (B) y suelo enmendado con IAS (C), tras 12 semanas de crecimiento del pimiento en condiciones controladas de invernadero y bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Tamaño muestral n=3. Los datos pertenecientes a las actividades enzimáticas, se detallan en el Anexo I.

4. Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

Tabla 4.1. Resultados estadísticos de la ANOVA de doble vía para los tres sustratos y tipos de fertilización y prueba *post hoc* de estos mismos parámetros. En el análisis de la varianza (A), los asteriscos indican significancia estadística y las siglas NS, no significancia. En los análisis *post hoc* para sustrato (B) y tipo de fertilización (C), letras diferentes indican valores significativamente diferentes y las siglas NS, no significancia para un valor de α de 0,05.

A)	Sustrato	Fertilizante	Sustrato*Fertilizante
Deshidrogenasa	*	*	*
Ureasa	*	NS	NS
Arilsulfatasa	*	NS	*
Fosfatasa ácida	*	NS	*
Fosfatasa alcalina	*	NS	NS
β -Glucosaminidasa	*	*	*

B)	Turba	Suelo	IAS
Deshidrogenasa	c	b	a
Ureasa	b	b	a
Arilsulfatasa	b	b	a
Fosfatasa ácida	b	c	a
Fosfatasa alcalina	b	b	a
β -Glucosaminidasa	a	b	a

C)	Agua	Convencional	TCA
Deshidrogenasa	b	a	b
Ureasa	NS	NS	NS
Arilsulfatasa	NS	NS	NS
Fosfatasa ácida	NS	NS	NS
Fosfatasa alcalina	NS	NS	NS
β -Glucosaminidasa	a	c	b

4.1.3. Perfil metabólico del sustrato

En el caso del número de sustratos utilizados (NSU), el tipo de sustrato y de fertilización sí influyeron en el valor del parámetro (Figura 4.3B). El suelo, con un valor medio de 29 compuestos, fue nuevamente el sustrato más destacable, seguido por el suelo enmendado con IAS (23), y finalmente la turba (20). En los tres sustratos, tanto la fertilización convencional como la aplicación del té de compost incrementaron el número de sustratos utilizados con respecto a la ausencia de fertilización.

Con respecto a la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUSE) no se observaron diferencias significativas entre los sustratos, obteniéndose valores medios del 28% en

turba, 27% en suelo y 30% en suelo enmendado con IAS (Figura 4.3C). En este caso, la fertilización no produjo cambios significativos en ninguno de los sustratos evaluados con respecto al riego solo con agua.

El tipo de sustrato también influyó significativamente en la velocidad de metabolización de cada sustrato (VMS) de las EcoMicroplates: En la turba, los carbohidratos fueron los sustratos consumidos preferentemente, seguidos por los ácidos carboxílicos y los aminoácidos, posteriormente los polímeros y finalmente las aminas y los compuestos fenólicos; en suelo también se metabolizaron más rápido los carbohidratos y los ácidos carboxílicos, seguidos por los aminoácidos, los polímeros y finalmente las aminas y los compuestos fenólicos; y por último, en el sustrato enmendado con

IAS se consumieron de forma más rápida los ácidos carboxílicos, seguidos por los carbohidratos y finalmente por el resto de compuestos (Tabla 4.2). Con respecto a la fertilización aplicada, los resultados no mostraron un patrón homogéneo: en la turba no se encontraron diferencias significativas; en suelo, la velocidad fue mayor con la aplicación de agua y TCA y, en el suelo enmendado con IAS fue mayor al fertilizar de forma convencional y con té de compost.

4.1.4. Crecimiento de la planta

El análisis biométrico mostró que las plantas de pimiento que experimentaron el mayor crecimiento fueron las crecidas en turba, no encontrándose diferencias significativas en el crecimiento entre el sustrato suelo y suelo enmendado con IAS. Además, en estos dos sustratos, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de fertilización aplicados

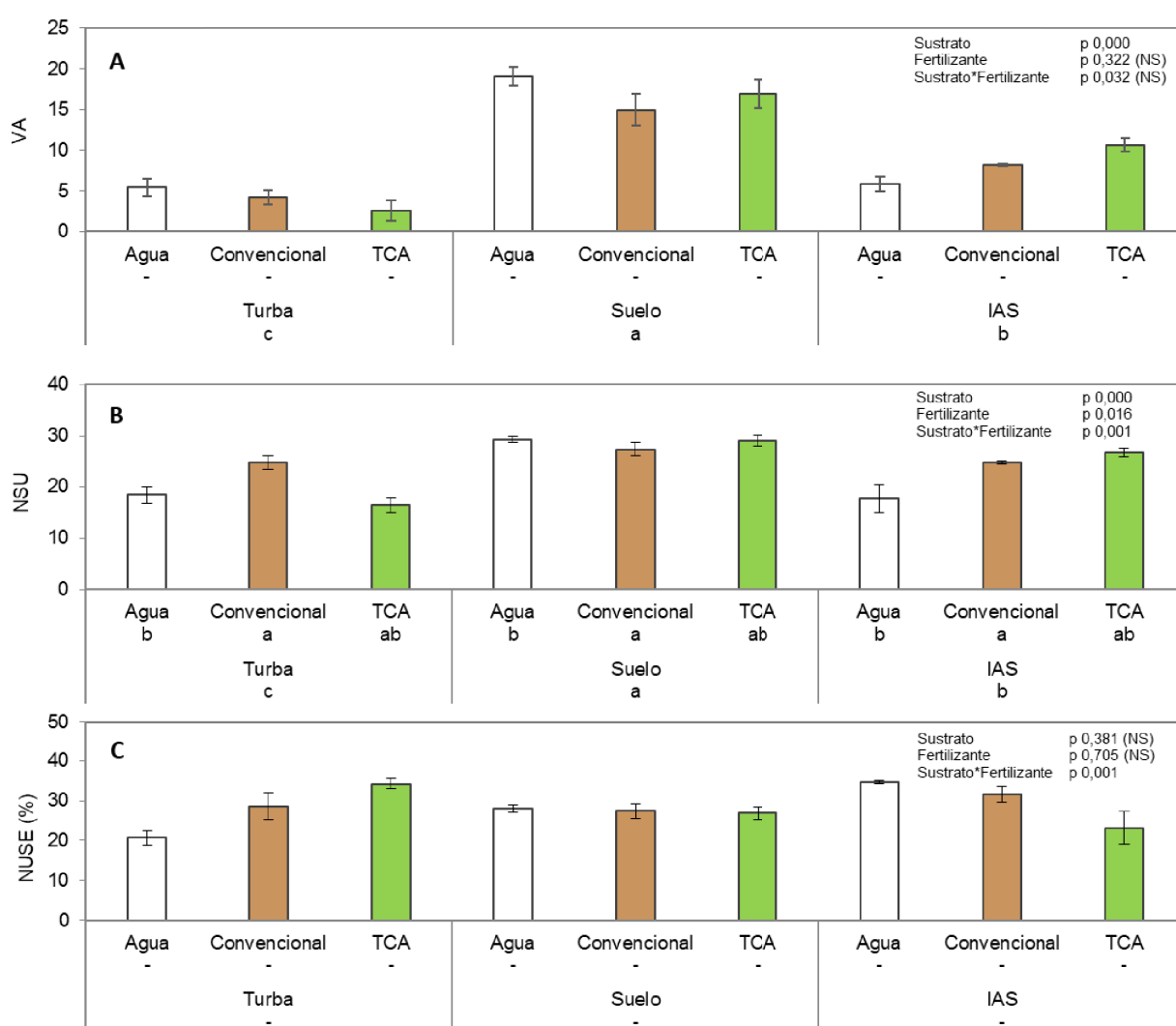


Figura 4.3. Figura 4.3. Velocidad de aclimatación (VA) (A), número de sustratos utilizados (NSU) (B) y eficiencia en el uso del nitrógeno (NUSE), expresado en porcentaje, (C) de los sustratos turba, suelo y suelo enmendado con insumo agrícola sólido (IAS), en los que crecieron las plantas de pimiento durante 12 semanas sometidas a diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=3.

4. Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

Tabla 4.2. Velocidad de metabolización de los sustratos (VMS) de las EcoMicroplates de la turba (A), suelo (B) y suelo enmendado con IAS (C) en el que crecieron plantas de pimienta bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras junto a los nombres de los compuestos y fertilizantes indican, según el análisis *post hoc*, el orden en el que son metabolizados. Tamaño muestral n=3.

Turba		Ácido Carboxílico	Amina	Aminoácido	Carbohidrato	Comp. fenólico	Polímero
		ab	c	ab	a	c	b
Agua	NS	0,097 ± 0,014	0,014 ± 0,014	0,097 ± 0,014	0,153 ± 0,037	0,014 ± 0,014	0,069 ± 0,014
Conv.	NS	0,083 ± 0,000	0,042 ± 0,024	0,153 ± 0,037	0,125 ± 0,024	0,042 ± 0,000	0,083 ± 0,000
TCA	NS	0,111 ± 0,028	0,028 ± 0,014	0,111 ± 0,028	0,125 ± 0,024	0,000 ± 0,000	0,111 ± 0,014

Suelo		Ácido Carboxílico	Amina	Aminoácido	Carbohidrato	Comp. fenólico	Polímero
		a	c	b	a	c	b
Agua	a	0,194 ± 0,014	0,056 ± 0,014	0,181 ± 0,014	0,208 ± 0,048	0,042 ± 0,000	0,125 ± 0,000
Conv.	b	0,125 ± 0,024	0,069 ± 0,014	0,083 ± 0,000	0,125 ± 0,024	0,042 ± 0,000	0,097 ± 0,014
TCA	a	0,181 ± 0,037	0,056 ± 0,014	0,125 ± 0,024	0,194 ± 0,028	0,042 ± 0,000	0,097 ± 0,014

IAS		Ácido Carboxílico	Amina	Aminoácido	Carbohidrato	Comp. fenólico	Polímero
		a	c	c	b	c	c
Agua	b	0,097 ± 0,037	0,056 ± 0,014	0,056 ± 0,014	0,111 ± 0,028	0,042 ± 0,000	0,083 ± 0,000
Conv.	a	0,208 ± 0,024	0,056 ± 0,014	0,083 ± 0,000	0,104 ± 0,012	0,042 ± 0,000	0,069 ± 0,014
TCA	a	0,194 ± 0,014	0,042 ± 0,000	0,083 ± 0,000	0,146 ± 0,012	0,042 ± 0,000	0,069 ± 0,014

(Figura 4.4). La única diferencia significativa encontrada en cuanto al tipo de fertilización fue que tanto la fertilización convencional, como con TCA favorecían el crecimiento en altura de las plantas crecidas en turba (Figura 4.4A).

4.2. EFECTIVIDAD SEGÚN LA ASEPSIA DEL SUSTRATO

4.2.1. Crecimiento y contenido en pigmentos

Según el estudio biométrico, la esterilidad del sustrato y el tipo de fertilización influyeron en la altura de la planta, alcanzándose los 31,75 cm y los 67,88 cm de altura en la turba no esterilizada y esterilizada fertilizada con TCA, respectivamente (Figura 4.5A). En cuanto al diámetro del tallo, el parámetro que resultó decisivo en el resultado fue la esterilidad del sustrato, presentando mayor diámetro del tallo aquellas plantas que se encontraban creciendo sobre sustrato esterilizado, llegando a alcanzar los 6,60 mm en el caso de la fertilización convencional (Figura 4.5B). Únicamente el tipo de fertilización determinó las diferencias en área

foliar total, independientemente del sustrato, encontrándose en los dos tipos de sustrato un área superior bajo fertilización convencional (Figura 4.5C). Por último, se observó que los peciolo de las hojas presentaban un ángulo de inserción distinto en el sustrato no esterilizado, siendo de 14 grados en las plantas regadas con agua, 16 grados en las plantas fertilizadas de forma convencional y 7 grados en las plantas con TCA, mientras que el ángulo promedio en el sustrato esterilizado era de 11 grados (Figura 4.5D).

El estudio de la biomasa mostró una clara influencia del tipo de fertilización en cada uno de los diferentes órganos de la planta. Así, en el sustrato esterilizado, la biomasa de raíz, tallo y hojas de las plantas fertilizadas de forma convencional fue superior a la del resto de tratamientos (0,70, 1,84 y 2,74 gramos de peso seco en raíz, tallo y hojas respectivamente). Solamente en el sustrato sin esterilizar, la biomasa de raíz de plantas fertilizadas con TCA (0,77 g PS) fue superior a la de las plantas con fertilizante convencional (0,63 g PS) (Figura 4.6).

Finalmente se pudo comprobar cómo el contenido en pigmentos se encontró fuertemente influido por la esterilidad del sustrato, no encontrándose diferencias en función de la fertilización. En general, en las plantas crecidas sobre sustrato esterilizado, el contenido en pigmentos se vio incrementado 1,5 veces con respecto a aquellas plantas crecidas sobre sustrato no esterilizado (Figura 4.7).

4.2.2. Características morfohistológicas más relevantes

En la figura 4.8 se muestran imágenes del sistema radical de plantas de los tratamientos del apartado 4.2. La primera característica reseñable es la distribución de las raíces secundarias a lo largo de la raíz principal. Mientras que bajo riego con agua (Figuras 4.8A y B) y

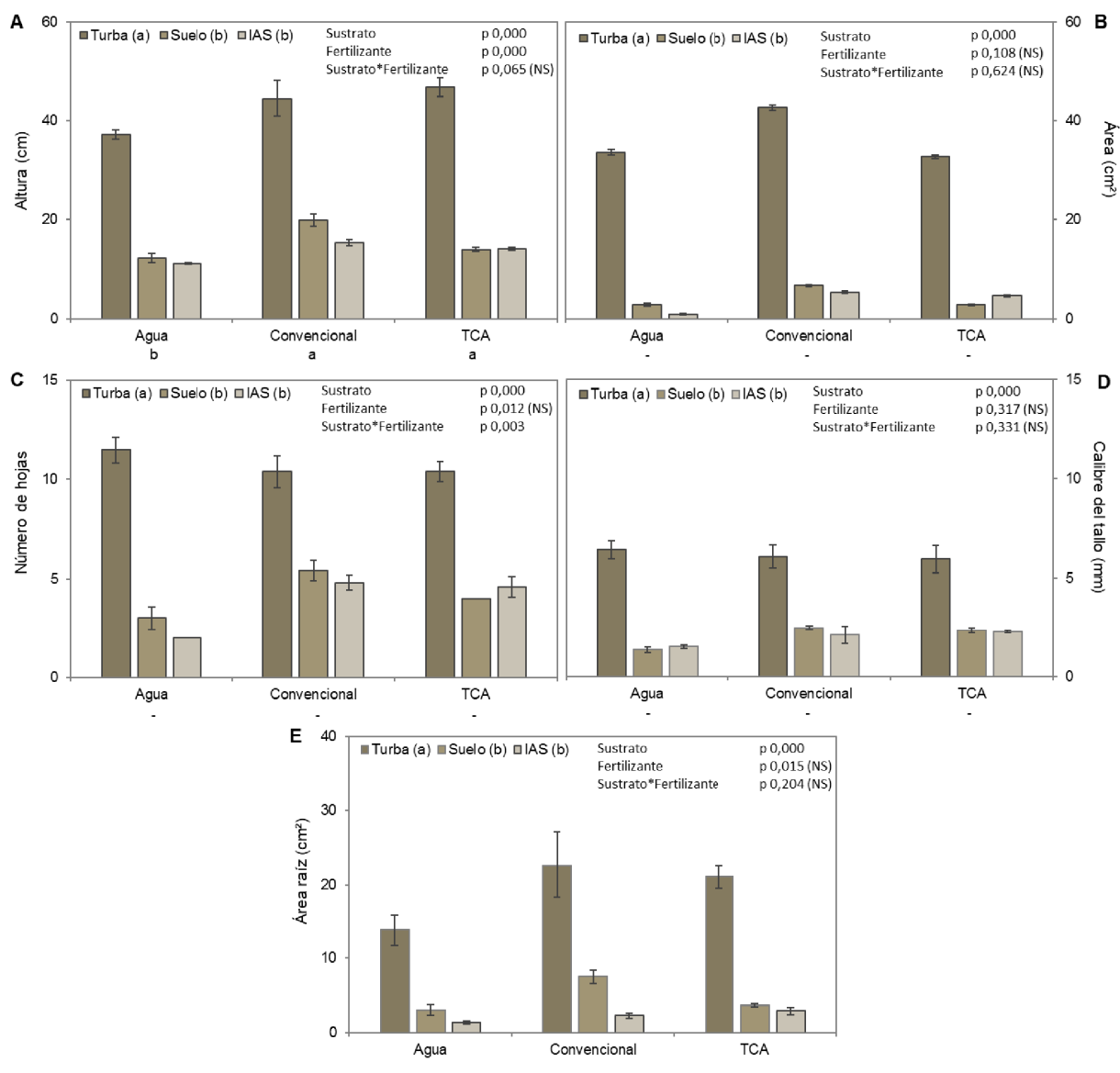


Figura 4.4. Biometría en base a A) altura (cm), B) área foliar total (cm²), C) número de hojas, D) diámetro del tallo (mm) y E) área radical (cm²) de las plantas de pimienta crecidas en turba, suelo y suelo enmendado con IAS, bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc* y NS, no significancia. Tamaño muestral n=6.

4. Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

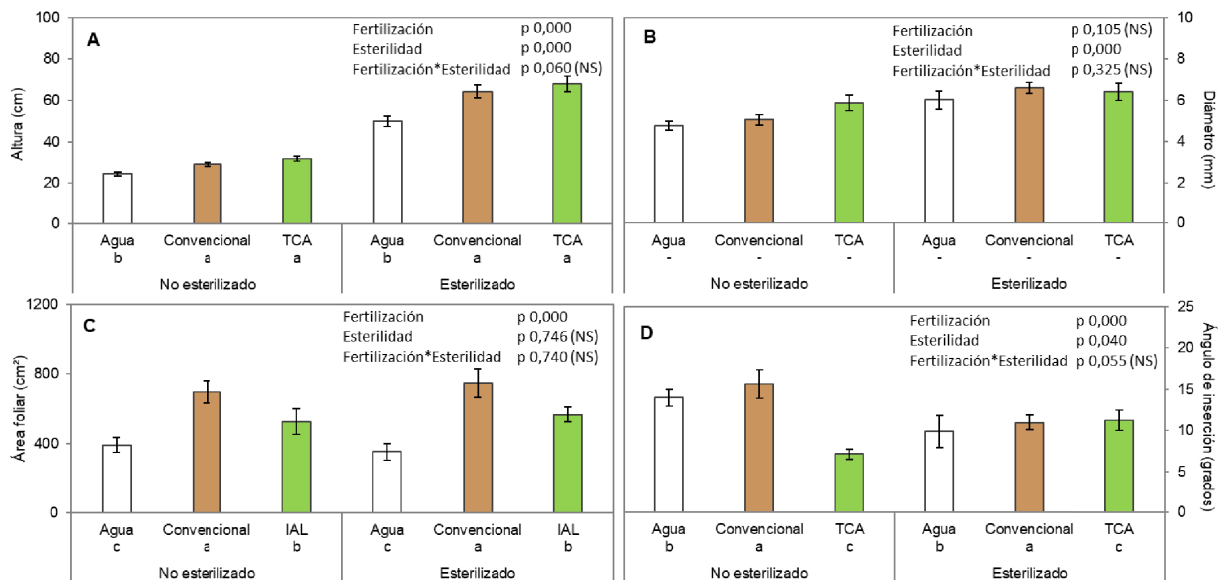


Figura 4.5. Biometría en base a A) altura (cm), B) diámetro del tallo en el cuello de raíz (mm), C) área foliar total (cm²) y D) ángulo de inserción del peciolo con respecto al tallo (grados) de las plantas de pimiento crecidas en turba esterilizada y no esterilizada bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc* y NS, no significancia. Tamaño muestral n=6.

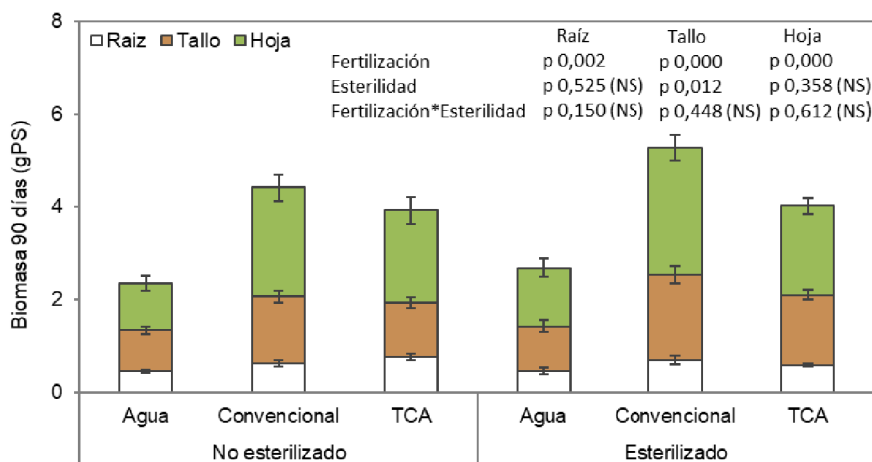


Figura 4.6. Contenido en biomasa, expresada en gramos de peso seco, de cada uno de los órganos de las plantas de pimiento crecidas en turba esterilizada y no esterilizada bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. NS indica no significancia según el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=6.

con fertilizante convencional (Figuras 4.8C y D), las raíces secundarias se situaban a ambos lados de la raíz principal, es decir en un único plano, las raíces de las plantas fertilizadas con TCA mostraban una distribución multiplano, ya que se desarrollaron radialmente en torno a la raíz principal (Figura 4.8E y F). Por otra parte, atendiendo al tipo de sustrato (autoclavado o no autoclavado) se observó un ligero incremento en longitud de la raíz principal y de las raíces secundarias en el tratamiento esterilizado (Figuras 4.8B, D y F).

Con respecto a la parte aérea se observó que, en el caso de las plantas fertilizadas con TCA, las hojas situadas a la mitad de la altura máxima del tallo se mantenían en una posición perpendicular con respecto al mismo (Figuras 4.9E y F), en contraposición con las hojas de plantas crecidas sin ningún tipo de fertilización (Figuras 4.9A y B) y con fertilizante convencional (Figuras 4.9C y D), que experimentaban una inclinación de 22,5 grados.

En los cortes transversales de los peciolo (Figura 4.10) se aprecia su típico contorno cóncavo-convexo. En ellos se observa la típica organización en arco del sistema vascular, con el floema rodeando al xilema por ambos lados. En la epidermis se pudo detectar la presencia de algunos tricomas, que en el caso de las plantas crecidas con TCA aumentaron considerablemente, tanto en tamaño como en número, principalmente, en la región cóncava (Figuras 4.10E y F). Además, el tra-

tamiento con agua (Figura 4.10A) presentó una pigmentación violácea perimetral que en el resto de tratamientos quedó relegada a la región cóncava, coincidente con la localización de los tricomas (Figuras 4.10C y E). En el tratamiento con TCA se pudo distinguir una acumulación de pigmentos fotosintéticos en gran parte de la sección del peciolo (Figura 4.10E) y mediante la tinción con lugol, reactivo amilófilo, fue posible detectar una mayor cantidad de esta sustancia de reserva en el tratamiento con agua (Figura 4.10B) en comparación con la fertilización convencional y TCA (Figuras 4.10D y F).

En el caso de los cortes del tallo, las diferencias fueron más evidentes en la sección longitudinal. Así, se pudo comprobar cómo la pigmentación perimetral observada en los peciolo se encontraba también en la epidermis del tallo de las plantas regadas con agua (Figura 4.11A) y con TCA (Figura 4.11E), extendiéndose en este último caso a lo largo del parénquima cortical. Además, se pudo comprobar que existía una acumulación de pigmentos fotosintéticos en el parénquima de las plantas de estos dos tratamientos, en contraposición con los tallos de la fertilización convencional, donde el parénquima no presentaba coloración (Figura 4.11C). En los cortes transversales (Figuras 4.11B, D y F) es posible apreciar una médula central sin pigmentación, la zona vascular con claros radios parenquimáticos y la región cortical con la epidermis.

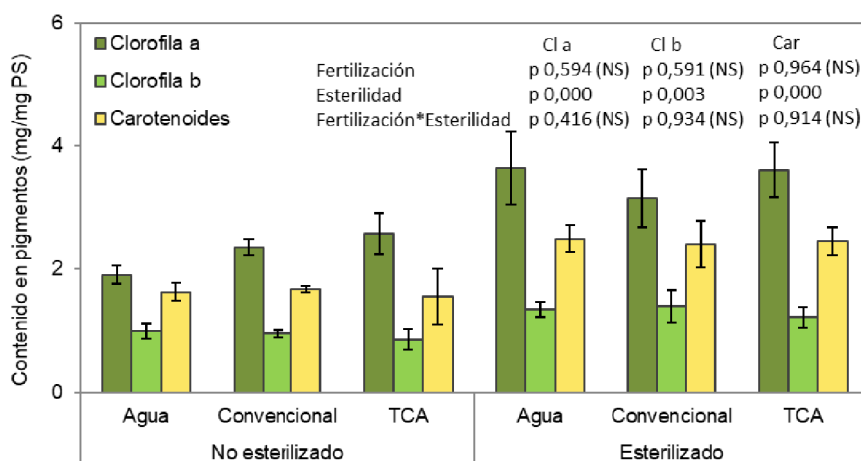


Figura 4.7. Contenido en Clorofila a, Clorofila b y Carotenoides en plantas de pimienta crecidas en turba esterilizada y no esterilizada bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. NS indica no significancia según el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=6.

4. Diagnóstico de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

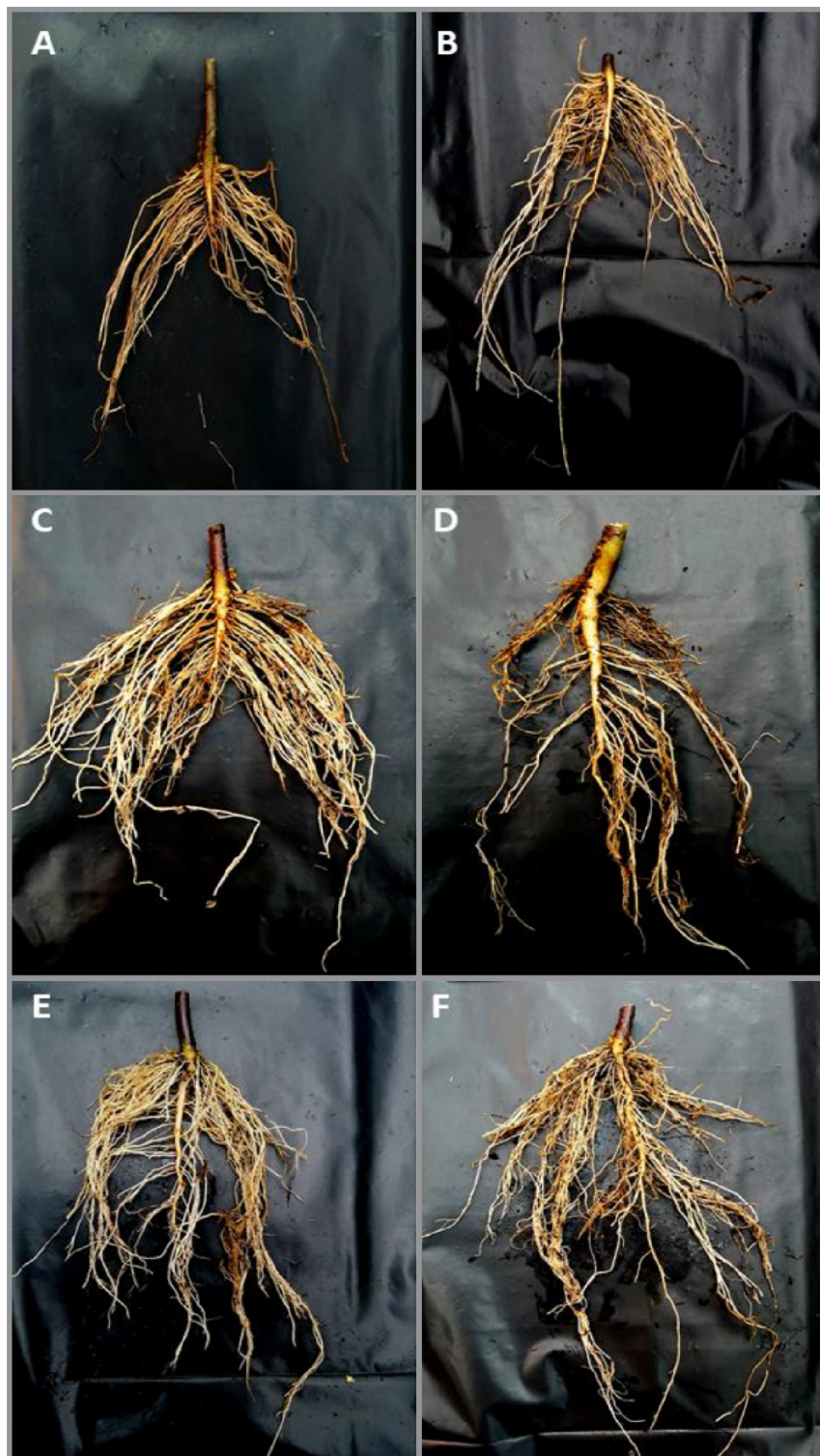


Figura 4.8. Raíces de plantas de pimienta regadas con agua y crecidas en turba A) no esterelizada y B) esterelizada; con fertilizante convencional y crecidas en turba C) no esterelizada y D) esterelizada; y con TCA y crecidas en turba E) no esterelizada y F) esterelizada.



Figura 4.9. Parte aérea de plantas de pimienta regadas con agua y crecidas en turba A) no esterelizada y B) esterelizada; con fertilizante convencional y crecidas en turba C) no esterelizada y D) esterelizada; y con TCA y crecidas en turba E) no esterelizada y F) esterelizada.

4. Diagnósis de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

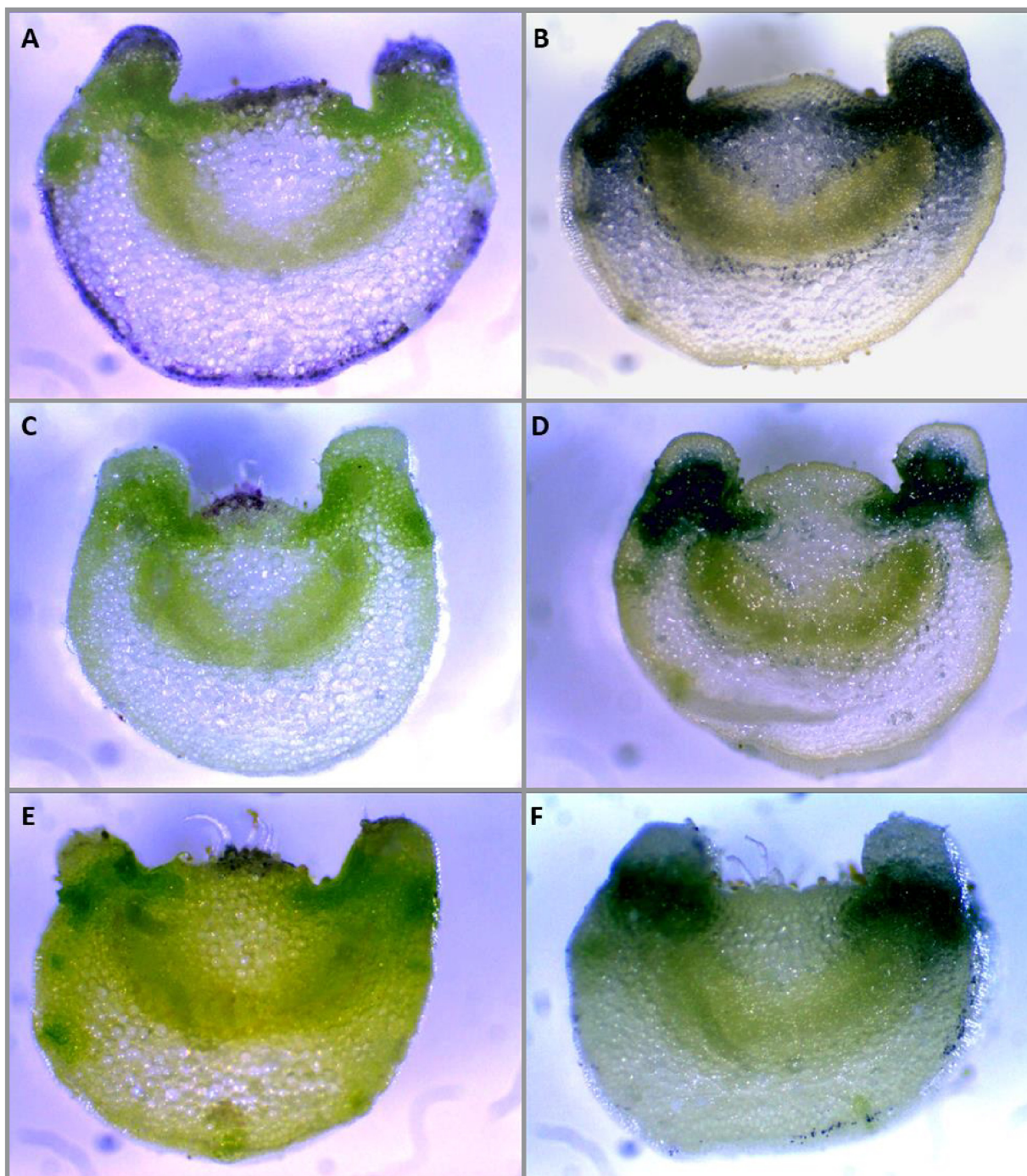


Figura 4.10. Secciones transversales, al microscopio óptico, de peciolo de hojas de plantas de pimiento regadas con agua y crecidas en turba sin esterilizar A) sin tinción y B) teñidas con lugol; con fertilizante convencional y crecidas en turba sin esterilizar C) sin tinción y D) con lugol y con TCA y crecidas en turba sin esterilizar E) sin tinción y F) con lugol.

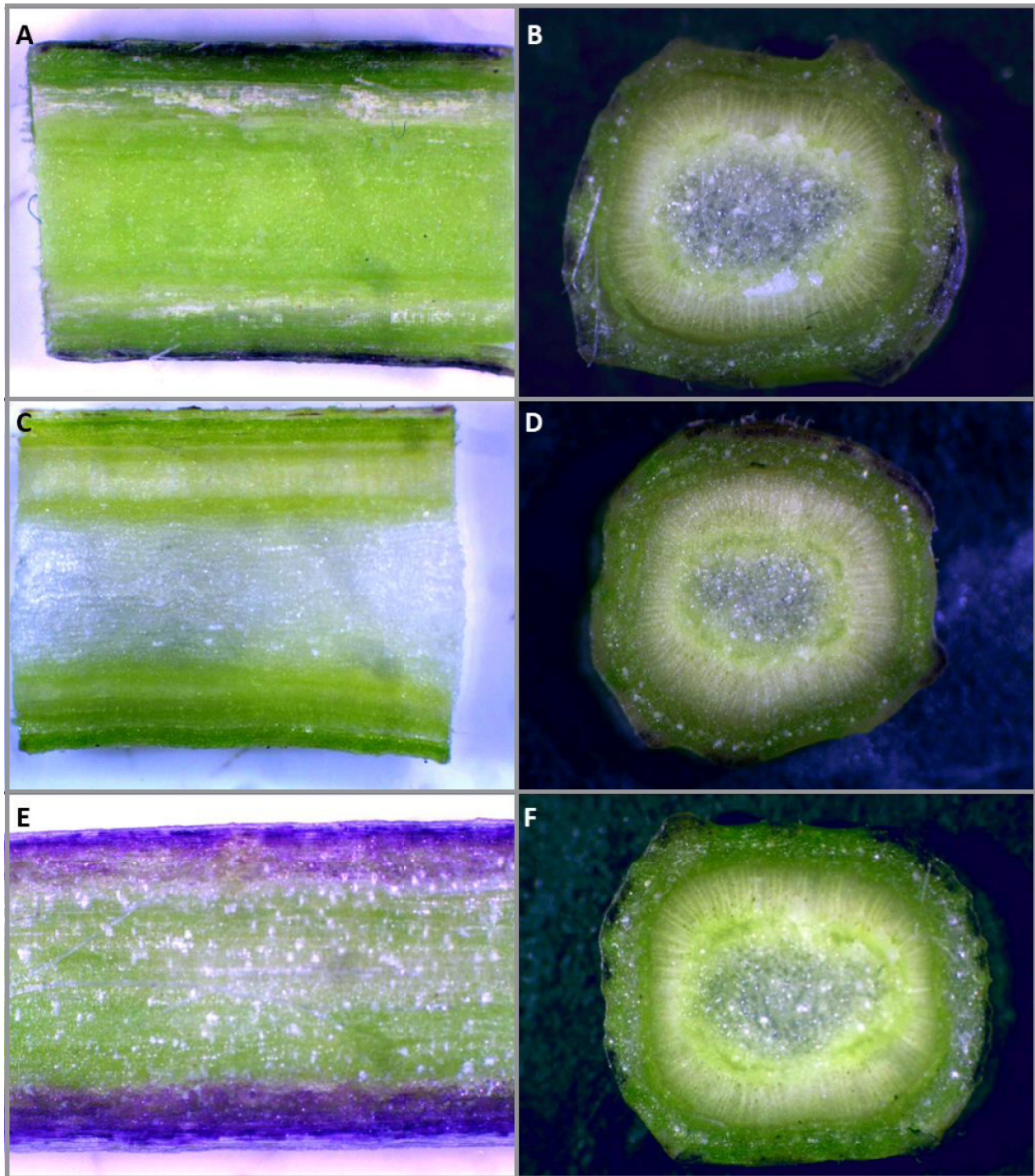


Figura 4.11. Secciones de tallos, al microscopio óptico, de plantas de pimiento regadas con agua y crecidas en turba sin esterilizar, en corte A) longitudinal y B) transversal; con fertilizante convencional y crecidas en turba sin esterilizar, en corte C) longitudinal y D) transversal y con TCA y crecidas en turba sin esterilizar, en corte E) longitudinal y F) transversal.

4. Diagnósis de la efectividad del TCA en función del tipo de sustrato

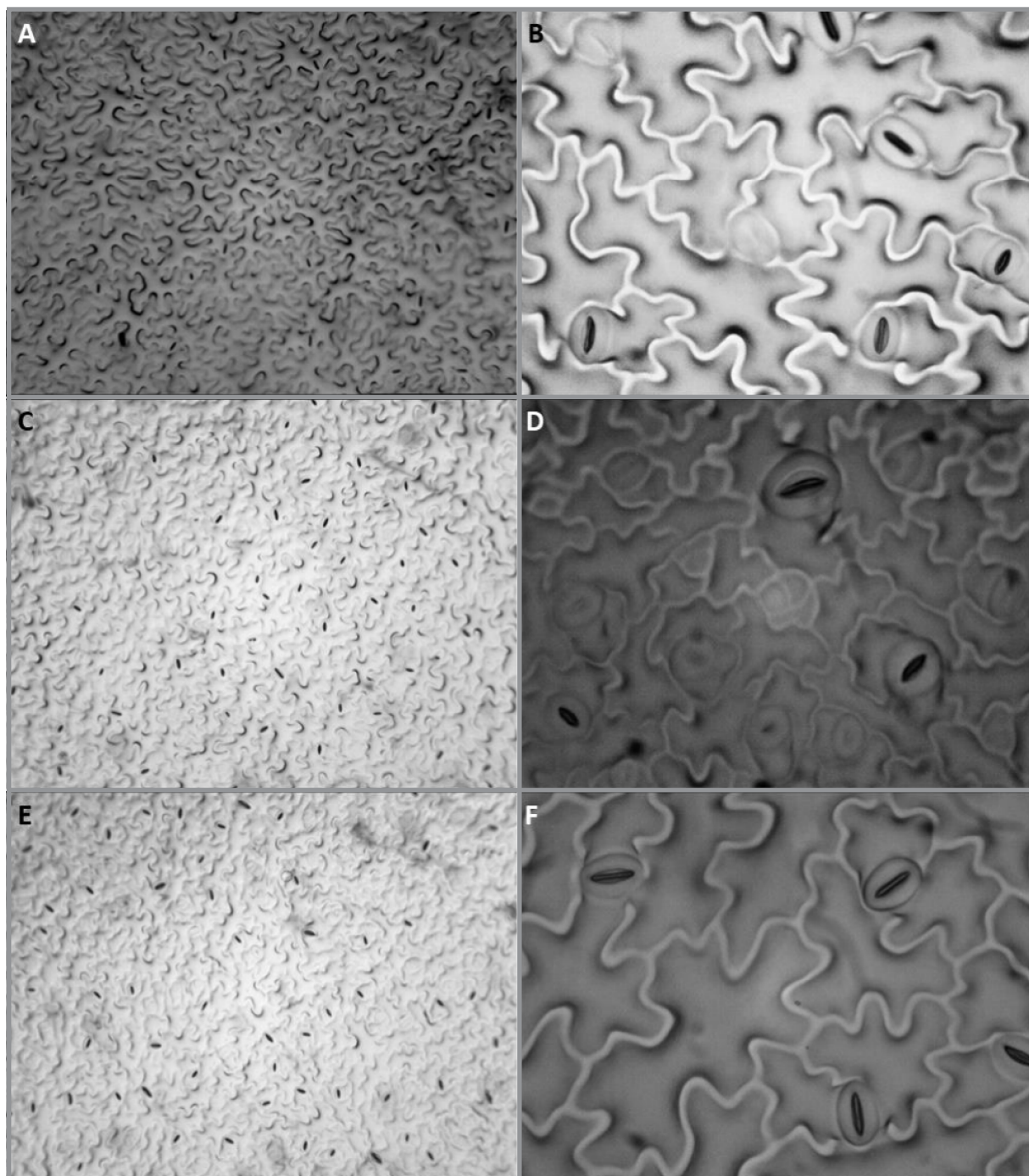


Figura 4.12. Imágenes al microscopio óptico de la epidermis de plantas de pimiento regadas con agua y crecidas en turba sin esterilizar, a A) 10x y B) 40x; con fertilizante convencional y crecidas en turba sin esterilizar, a C) 10x y D) 40x y con TCA y crecidas en turba sin esterilizar, a E) 10x y F) 40x.

Finalmente, se analizaron imágenes de la cara abaxial de las hojas, en las que se pudo apreciar las características células epidérmicas y se localizaron los típicos estomas anomocíticos (sin células anexas) parcialmente abiertos (Figura 4.12). Aunque se percibieron algunas

diferencias entre los tratamientos, observándose un promedio que osciló entre los 7 y los 10 estomas por mm^2 en plantas fertilizadas con TCA y de forma convencional respectivamente, éstas no fueron significativas.





**Valoración de la
calidad del sistema
suelo-planta
(hortícola) en
función de la
fertilización en
condiciones de
campo**



Con el fin de evaluar la efectividad del té de compost en campo, en condiciones medioambientales no controladas, y llevando a cabo el ciclo de cultivo completo, se realizaron dos estudios, en los que, además de la actividad metabólica del sustrato y del crecimiento de las plantas, se pudo analizar el efecto a nivel de producción y de características del fruto.

5.1. CULTIVO DE PIMIENTO

Se ha evaluado el efecto del té de compost en el cultivo de pimiento en suelo distribuido en bancales, cada uno de los cuales recibió una enmienda diferente: arena (bancal *Arenoso*), estiércol (bancal *Arcilloso*) e insumo sólido procedente de la fracción sólida tras la extracción del té de compost (bancal *IAS*). El efecto se ha valorado con relación a la actividad metabólica del suelo y al crecimiento de las plantas, pero también a nivel de producción y de calidad del fruto.

5.1.1. Características físico-químicas del sustrato

Transcurridos 6 meses de crecimiento tras el trasplante se observó que el valor de pH de los bancales no varió en función del tipo de fertilización, aunque sí lo hizo en función de la enmienda añadida al suelo antes del establecimiento de las plantas de pimiento. Los valores de pH oscilaron entre 8,4 del bancal arenoso fertilizado de forma convencional y 7,8 del bancal IAS fertilizado con té de compost (Figura 5.1A).

Por otra parte, el valor de la conductividad electrolítica mostró efecto significativo de ambos factores: sustrato y fertilizante. La conductividad más alta se detectó en el bancal enmendado con IAS tratado con TCA (163,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$), significativamente más elevado que el del que recibió fertilización convencional en este mismo bancal (108,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$). De modo similar, en el bancal arcilloso la conductividad del suelo tratado con té de compost (131,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$) fue mayor que el del fertilizado de

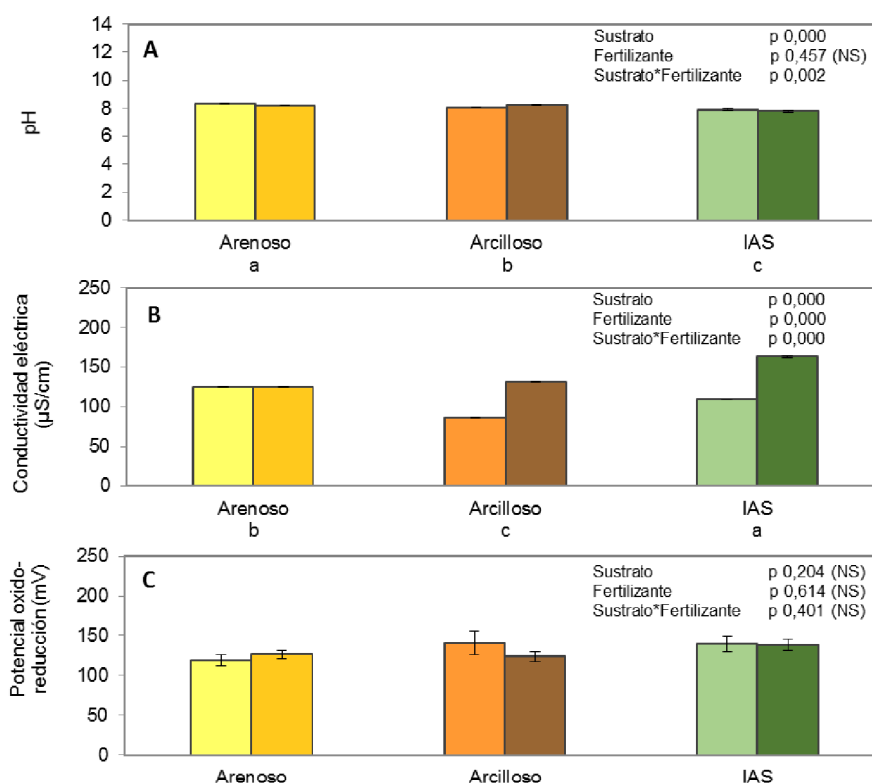


Figura 5.1. A) Valores de pH, B) conductividad electrolítica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y C) potencial de oxido-reducción (mV) del suelo de los bancales arenoso, arcilloso y enmendado con IAS, en los que crecieron plantas de pimiento durante 6 meses en condiciones de campo y sometidos a diferente régimen de fertilización: convencional (color claro) y TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc* y NS indica no significancia. Tamaño muestral $n=3$.

Tabla 5.1. Resultados estadísticos de (A) la ANOVA de doble vía para los tres bancales (arenoso, arcilloso y enmendado con IAS) y sus diferentes tipos de fertilización (convencional y TCA) y (B) prueba *post hoc* de estos mismos factores. Letras diferentes indican valores significativamente diferentes y NS, no significancia para valores de $\alpha \leq 0,05$.

A)	Sustrato	Fertilizante	Sustrato*Fertilizante
Deshidrogenasa	*	*	NS
Ureasa	*	NS	*
Arilsulfatasa	*	NS	NS
Fosfatasa ácida	*	NS	*
Fosfatasa alcalina	*	*	*
β -Glucosaminidasa	*	NS	*

B)	Arenoso	Arcilloso	IAS
Deshidrogenasa	b	a	b
Ureasa	b	a	a
Arilsulfatasa	b	a	a
Fosfatasa ácida	c	a	b
Fosfatasa alcalina	c	a	b
β -Glucosaminidasa	b	a	a

forma convencional (86,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Sin embargo, en el bancal arenoso no se encontraron diferencias entre el tipo de fertilización aplicada, obteniéndose una conductividad de 124,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Figura 5.1B)

Con respecto al potencial de oxidación-reducción, no se encontraron diferencias entre los tres tipos de sustratos y el tipo de fertilización tampoco resultó un parámetro determinante a la hora de delimitar su valor. Los valores de potencial rondaron los 122,9 mV en el bancal arenoso, 132,5 mV en el bancal arcilloso y 139,3 mV en el bancal enmendado con IAS (Figura 5.1C).

5.1.2. Actividad metabólica del sustrato

El tipo de enmienda adicionada al suelo fue la que condicionó principalmente las diferencias de actividad enzimática microbiana observadas en los bancales. Entre bancales, el bancal arcilloso fue el que exhibió una mayor actividad enzimática, seguido por el bancal con IAS y el bancal arenoso. En cuanto al tipo de fertilización, únicamente influyó en las diferencias observadas en la actividad deshidrogenasa y la fosfatasa alcalina (Figura 5.2, Tabla 5.1).

5.1.3. Perfil metabólico del sustrato

El análisis de los datos obtenidos en los ensayos con EcoMicroplates muestra que tanto el tipo de sustrato

como de fertilizante influyeron en la velocidad de aclimatación (VA) de las poblaciones microbianas, siendo la población del bancal arenoso la que experimentó un crecimiento más lento en comparación con los otros dos bancales. En los tres sustratos evaluados es de destacar la mayor velocidad encontrada en los suelos a los que se le aplicó el té de compost, en especial el arcilloso y el enmendado con IAS. Así, los valores obtenidos para la fertilización convencional y la fertilización con TCA fueron, respectivamente, 1,0 y 2,6 en el bancal arenoso; 5,4 y 18,7 en el bancal arcilloso y 3,3 y 16,4 en el bancal enmendado con IAS (Figura 5.3A).

En cuanto al número de sustratos utilizados (NSU), se repitió el mencionado patrón, observándose que las poblaciones microbianas del bancal arenoso no fueron capaces de utilizar tantos sustratos como las de los otros dos bancales. Además del tipo de sustrato, el fertilizante empleado también influyó en la capacidad de metabolización de los sustratos de las EcoMicroplates, siendo el número significativamente mayor en los suelos tratados con té de compost, que en los fertilizados de forma convencional: 5,7 frente a 3,0 en el bancal arenoso, 18,7 frente a 6,3 en el bancal arcilloso y 19,0 frente a 6,7 en el bancal enmendado con IAS (Figura 5.3B).

Por último, la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUSE) de los bancales también fue dependiente tanto del sustrato, como del fertilizante, obteniéndose mayores va-

5. Valoración de la calidad del sistema suelo-plantas en función de la fertilización en condiciones de campo

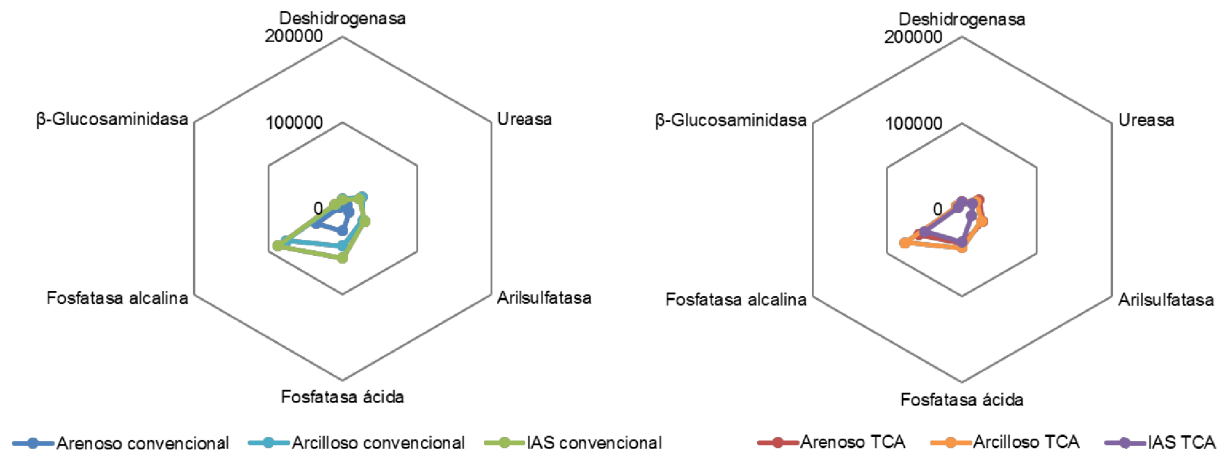


Figura 5.2. Actividades, en mg de sustrato · kg suelo seco⁻¹ · h⁻¹, de seis tipos de enzimas microbianas, medidas en los suelos de los bancales arenoso, arcilloso y enmendado con IAS, en los que crecieron durante 6 meses las plantas de pimienta bajo diferente régimen de fertilización: convencional (izquierda) y TCA (derecha). Tamaño muestral n=3.

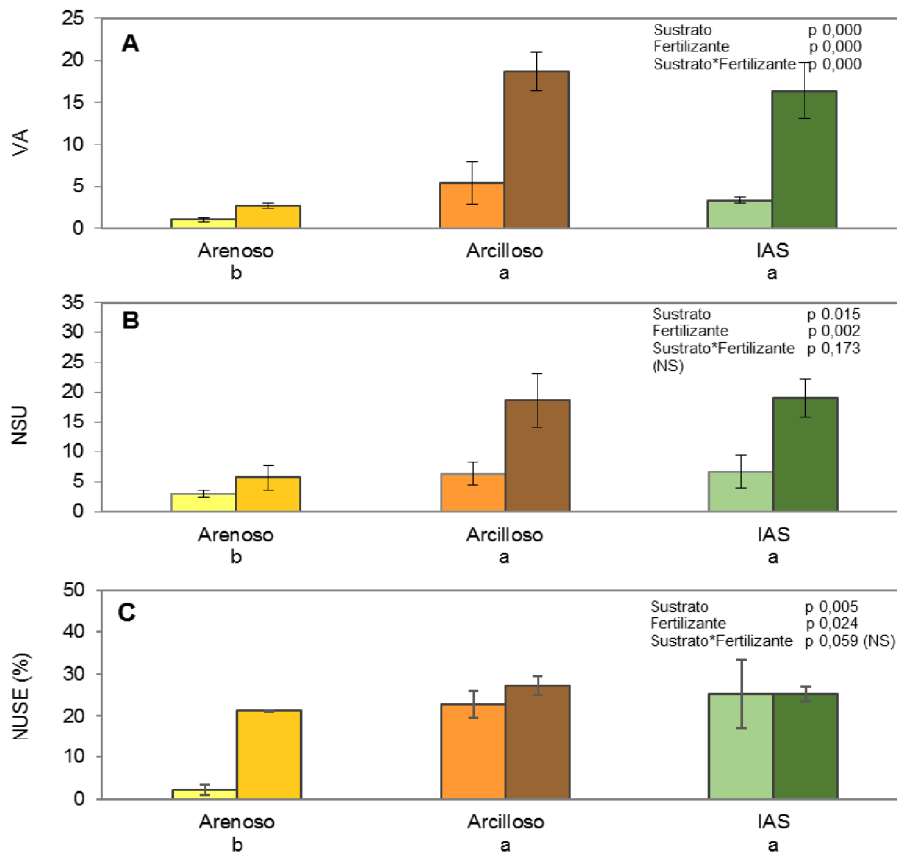


Figura 5.3. A) Velocidad de aclimatación (VA), B) número de sustratos utilizados (NSU) y C) eficiencia en el uso del nitrógeno (NUSE), expresado en porcentaje, de los suelos de los bancales (arenoso, arcilloso y enmendado con IAS), en los que crecieron plantas de pimienta durante 6 meses, sometidas a diferente régimen de fertilización: convencional (color claro) y TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) indican significancia distinta en el análisis *post hoc* y NS indica no significancia. Tamaño muestral n=3.

Tabla 5.2. Velocidad de metabolización de los sustratos (VMS) de las poblaciones bacterianas de los bancales (arenoso, arcilloso y enmendado con IAS), en los que crecieron plantas de pimiento durante 6 meses, sometidas a diferente régimen de fertilización: convencional y TCA. Las letras bajo los nombres de los compuestos indican, según el análisis *post hoc*, el orden en el que son metabolizados. Tamaño muestral n=3.

		Ácido carboxílico	Amina	Aminoácido	Carbohidrato	Comp. Fenólico	Polímero
		a	b	b	a	b	a
Arenoso conv.	b	0,014 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,014 ± 0,014	0,000 ± 0,000	0,069 ± 0,014
Arenoso TCA	b	0,056 ± 0,028	0,014 ± 0,014	0,028 ± 0,028	0,014 ± 0,014	0,028 ± 0,014	0,069 ± 0,014
Arcilloso conv.	b	0,056 ± 0,014	0,028 ± 0,014	0,014 ± 0,014	0,028 ± 0,028	0,014 ± 0,014	0,069 ± 0,014
Arcilloso TCA	a	0,083 ± 0,024	0,014 ± 0,014	0,069 ± 0,028	0,125 ± 0,048	0,042 ± 0,000	0,083 ± 0,000
IAS conv.	b	0,056 ± 0,014	0,014 ± 0,014	0,028 ± 0,028	0,028 ± 0,014	0,028 ± 0,014	0,069 ± 0,014
IAS TCA	a	0,139 ± 0,050	0,028 ± 0,014	0,042 ± 0,024	0,139 ± 0,028	0,028 ± 0,014	0,097 ± 0,014

lores en los tratamientos con té de compost. Así en el bancal arenoso fue de un 2,2% para la fertilización convencional y 21,3% para TCA; en el bancal arcilloso 22,8% y 27,3%, respectivamente, y en el bancal enmendado con IAS 25,3% en ambos casos (Figura 5.3C).

Con respecto a la velocidad de metabolización de los sustratos (VMS) de las EcoMicroplates, fueron las poblaciones microbianas del bancal IAS y del bancal arcilloso fertilizados con TCA las que más rápidamente metabolizaron los compuestos. En conjunto, los compuestos más rápidamente consumidos fueron los polí-

meros, los ácidos carboxílicos y los carbohidratos, seguidos por los aminoácidos, los compuestos fenólicos y las aminas (Tabla 5.2).

5.1.4. Crecimiento de la planta

5.1.4.1. Crecimiento en fase de semillero

Transcurridos 30 días desde la germinación de la semilla, finalizada la fase de semillero, se realizó un amplio estudio para comprobar la salud de la planta antes de su trasplante a campo. La valoración biométrica de las

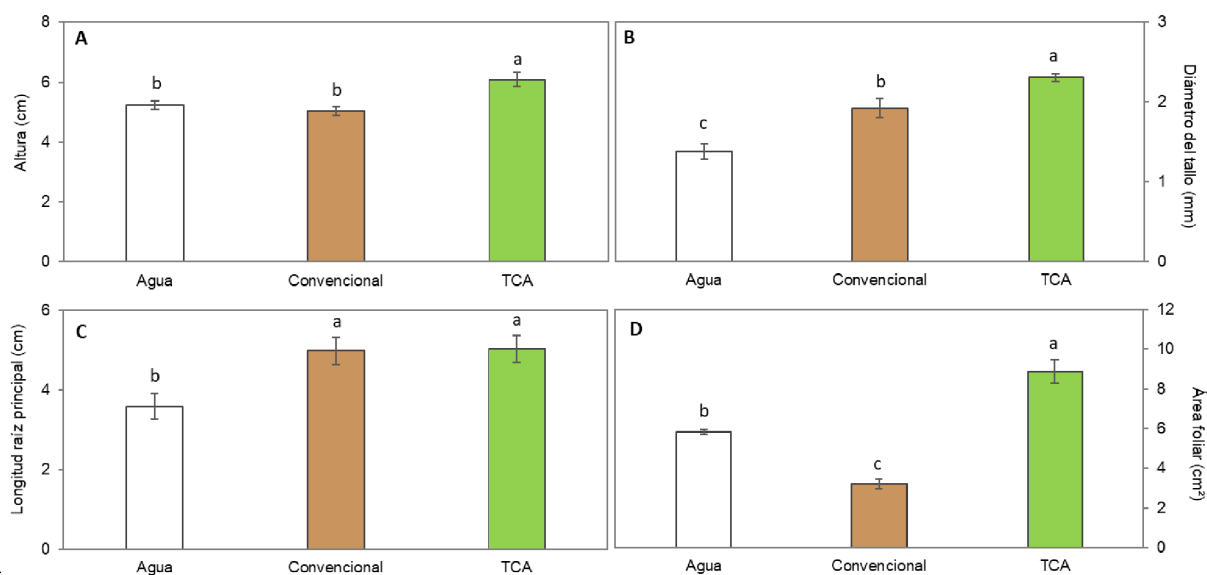


Figura 5.4. Biometría expresada en A) altura en centímetros, B) diámetro del tallo en milímetros, C) longitud de la raíz principal en centímetros y D) área foliar en centímetros cuadrados, de las plántulas de pimiento crecidas durante 30 días en semillero con turba bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=6.

5. Valoración de la calidad del sistema suelo-plantas en función de la fertilización en condiciones de campo

plántulas mostró que aquellas plantas fertilizadas con TCA presentaban un crecimiento significativamente mayor en promedio (6,08 cm) que aquellas plantas fertilizadas de forma convencional (5,03 cm) o regadas con agua (5,23 cm) (Figura 5.4A). El diámetro del tallo también fue mayor en las plantas de pimiento fertilizadas con TCA (2,30 mm), frente a aquellas bajo tratamiento convencional (1,92 mm) y riego con agua (1,38 mm) (Figura 5.4B). No sólo el efecto fue observable en la parte aérea, sino que la longitud de la raíz principal también fue un parámetro favorecido positivamente por el té de compost (5,03 cm) en comparación con las plantas crecidas solo con agua (3,58 cm), aunque en este caso no diferenciable del efecto observado en las plantas fertilizadas de forma convencional (4,98 cm)

(Figura 5.4C). En el cuarto parámetro estudiado, la superficie foliar, fue donde se encontraron las mayores diferencias, destacando el incremento observado en las plantas fertilizadas con el té de compost (8,88 cm²/hoja), frente a las que recibieron fertilizante convencional (3,21 cm²/hoja) o sólo agua (5,84 cm²/hoja) (Figura 5.4D).

Con respecto a la biomasa en peso fresco fue mayor bajo fertilización con TCA en todos los órganos de la planta, consiguiéndose con respecto a la fertilización convencional 3 veces más de biomasa foliar, 2,5 veces más de biomasa en el tallo y 1,6 veces más de biomasa radicular (Figura 5.5A). Con respecto a la biomasa en peso seco, salvo en el tallo, donde no hubo diferencias

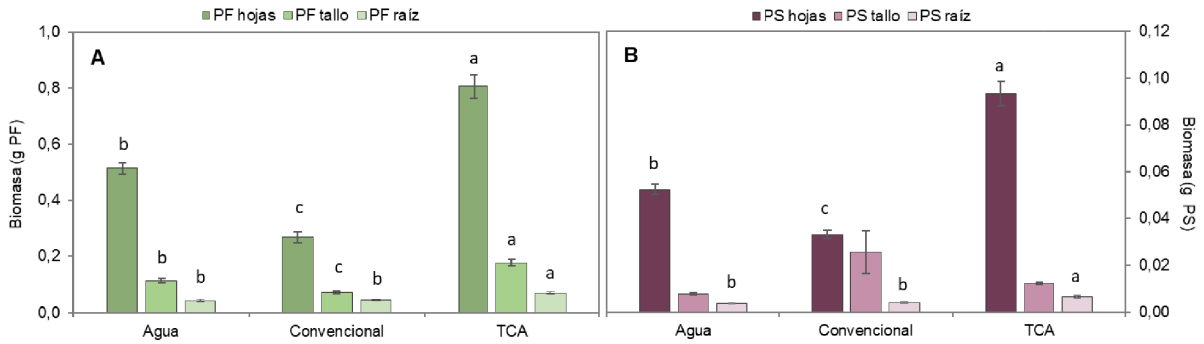


Figura 5.5. Contenido en biomasa en A) peso fresco y B) peso seco de las plántulas de pimiento crecidas durante 30 días en semillero con turba bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras (a, b, c) indican significancia distinta en el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=6.

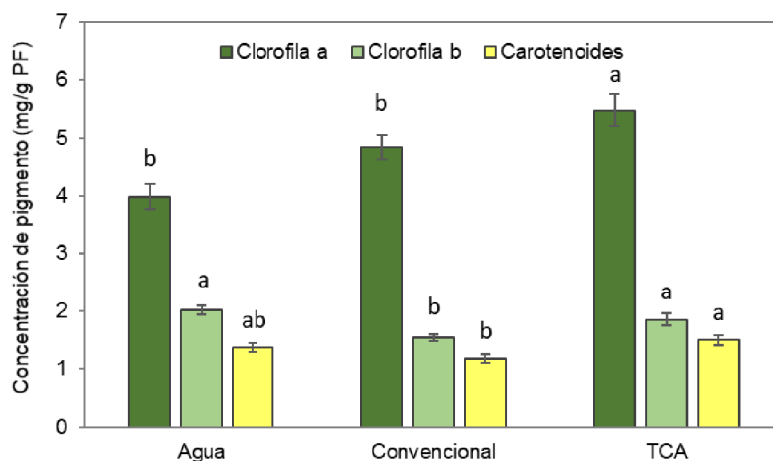


Figura 5.6. Concentración de pigmento por gramo de peso fresco de las hojas de las plántulas de pimiento crecidas durante 30 días en semillero con turba, bajo diferente régimen de fertilización: solo agua, convencional y TCA. Las letras (a, b, c) indican significancia distinta en el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=6.

entre tratamientos, la biomasa foliar de plantas fertilizadas con TCA frente a las fertilizadas de forma convencional fue 2,8 veces superior y la biomasa radicular, 1,6 veces mayor (Figura 5.5B).

No sólo el área y la biomasa foliar fueron mayores, sino que aquellas plantas que recibieron el té de compost

también presentaron una concentración mayor de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores por unidad de masa (Figura 5.6). Las hojas de las plantas crecidas con TCA tenían más Clorofila a (5,5 mg Cla/g PF), Clorofila b (1,8 mg Clb/g PF) y Carotenoides (7,3 mg Car./g PF) que las regadas solo con agua (4,0 mg Cla/g PF; 2,0 mg Clb/g PF y 6,0 mg Car./g PF) e incluso que las fer-

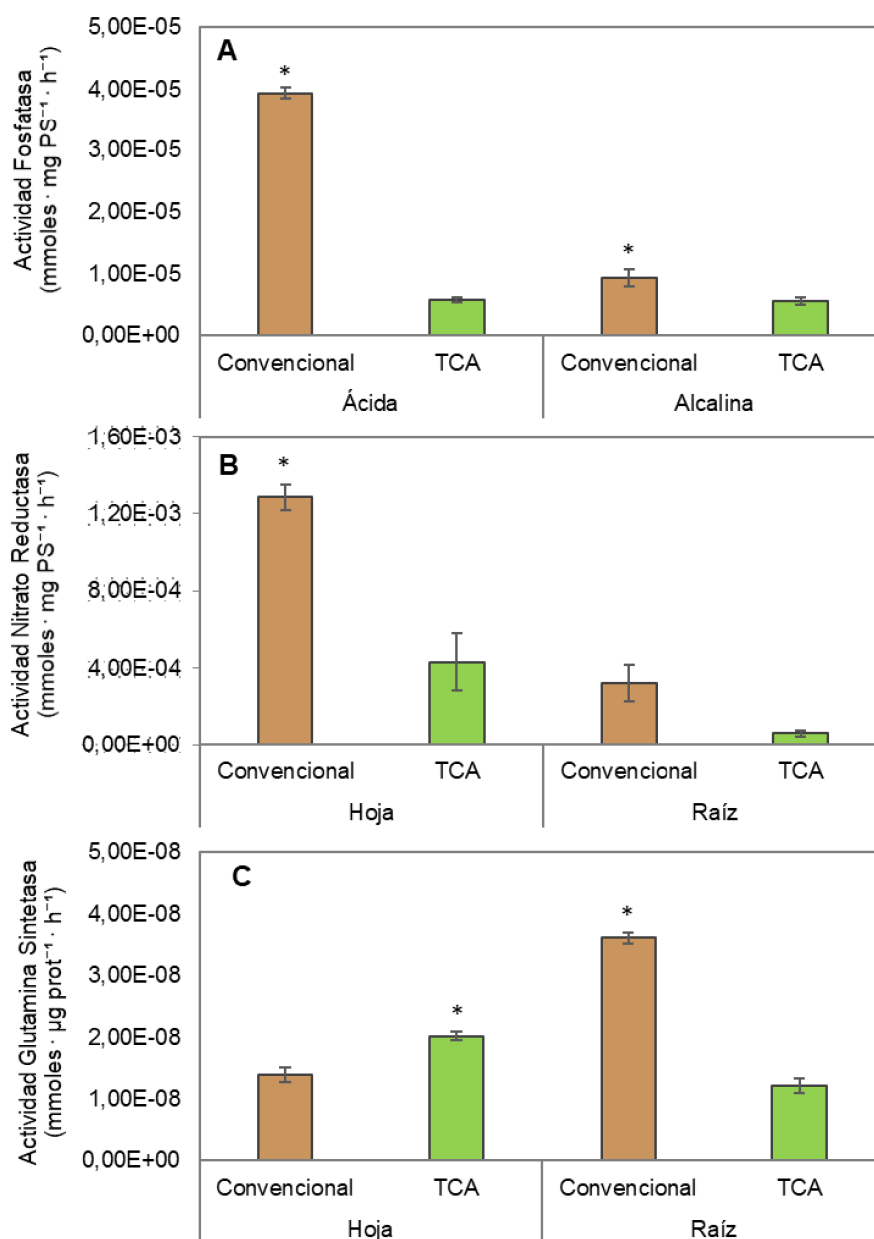


Figura 5.7. Actividad enzimática de A) Fosfatasa ácida y alcalina, B) Nitrato Reductasa y C) Glutamina Sintetasa en las hojas y la raíz de plántulas de pimentero crecidas en semillero sobre turba bajo riego con fertilización convencional y con TCA. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al otro tratamiento según el test de la T de Student. Tamaño muestral n=8.

tilizadas de forma convencional (4,8 mg Cla/g PF; 1,5 mg Clb/g PF y 6,4 mg Car./g PF). Además, la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) fue también mayor en las plantas que recibieron el té de compost (0,788 ± 0,002 a), que en las plantas de fertilización convencional (0,777 ± 0,005 b) y de riego con agua (0,776 ± 0,002 b). Finalmente, se llevó a cabo la determinación, en hoja y en raíz, de la actividad de los enzimas Fosfatasa (ácida y alcalina), Nitrato Reductasa y Glutamina Sintetasa. Las plantas fertilizadas de forma convencional presentaron una actividad Fosfatasa ácida y alcalina 6,9 y 1,7 veces superior, respectivamente, a las fertilizadas con TCA (Figura 5.7A). Además, en las plantas tratadas con fertilización convencional, la actividad Nitrato Reductasa fue casi 3 veces superior a la de las tratadas con TCA en hoja y cinco veces superior en raíz (Figura 5.7B); por el contrario, la actividad Glutamina Sintetasa en hojas de plantas fertilizadas con TCA fue 1,5 veces superior a la convencional; mientras que en la raíz de plantas fertilizadas de forma convencional, esta actividad fue 3 veces superior a la de las raíces de plantas fertilizadas con TCA (Figura 5.7C).

5.1.4.2 Crecimiento en bancal

Una vez finalizado el periodo de crecimiento (30 días en semillero + 6 meses en bancal) se realizaron diferentes medidas biométricas (Figura 5.8).

Las plantas crecidas en suelo enmendado con IAS y fertilizadas con TCA presentaron mayores valores en biométrica y en biomasa que las fertilizadas de forma convencional: una altura media de 87,1 cm (Figura 5.8A), un diámetro de copa de 72,0 cm (Figura 5.8B), un diámetro medio del cuello de raíz de 20,9 mm (Figura 5.8C), y un peso seco medio de hojas, tallo y raíz de 92,3, 137,8, y 48,7 gramos respectivamente (Figuras 5.8D, E y F).

Las plantas crecidas en suelo arcilloso y con fertilización convencional presentaron mayores valores en biométrica que las fertilizadas con TCA: una altura media de 78,4 cm (Figura 5.8A), un diámetro de copa de 71,0 cm (Figura 5.8B) y un diámetro medio del cuello de raíz de 17,8 mm (Figura 5.8C); Sin embargo, los valores de

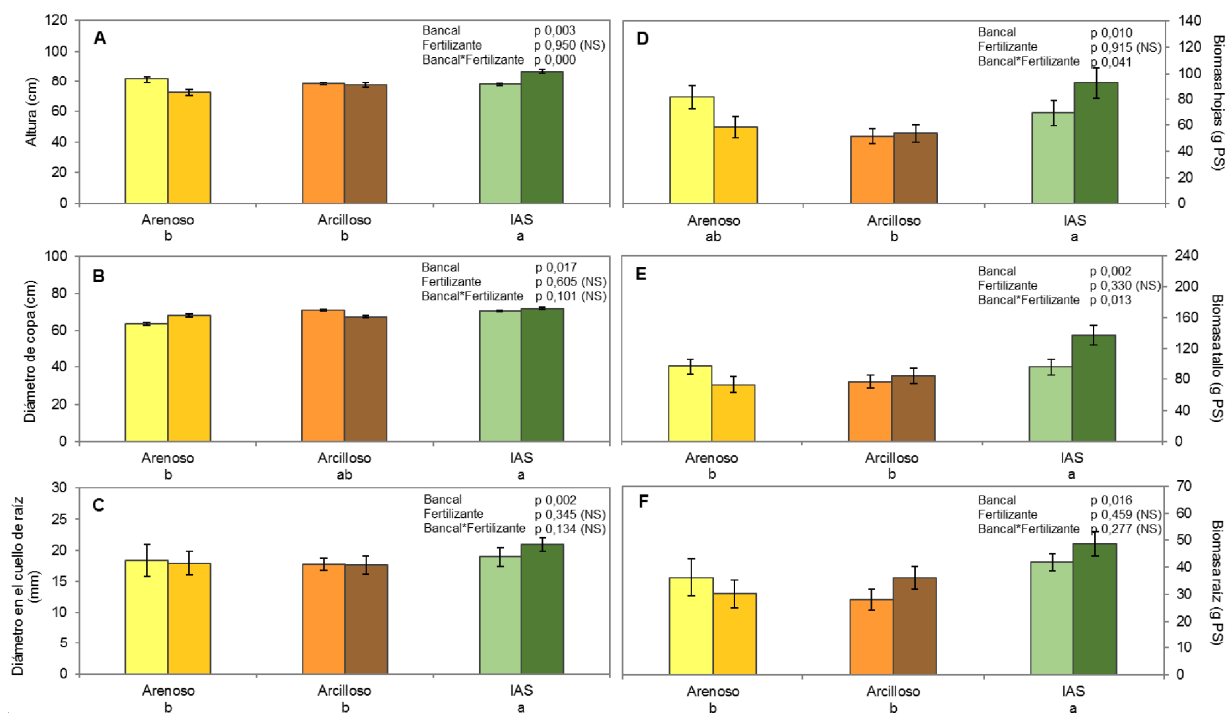


Figura 5.8. A) altura (cm), B) diámetro de la copa (cm), C) diámetro del cuello de raíz (mm), D) biomasa foliar (g Peso Seco), E) biomasa del tallo (g Peso Seco) y F) biomasa radicular (g Peso Seco) de las plantas de pimienta crecidas durante 6 meses en bancal arenoso, arcilloso y enmendado con IAS y fertilizados de forma convencional (color claro) y con TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) bajo los tratamientos indican diferencias significativas según el test *post hoc* y NS indica no significancia. Tamaño muestral n=12.

biomasa fueron mayores bajo riego con TCA, con un peso seco medio de hojas, tallo y raíz de 53,7, 84,2, y 36,1 gramos respectivamente (Figuras 5.8D, E y F).

Por último, las plantas crecidas en suelo arenoso y con fertilización convencional fueron las que presentaron mayor desarrollo, con una altura media de 81,3 cm (Figura 5.8A), un diámetro medio del cuello de raíz de 18,3 mm (Figura 5.8B) y una biomasa en peso seco de hojas, tallo y raíz de 81,4, 96,7 y 36,2 gramos respectivamente (Figuras 5.8D, E y F). Únicamente el diámetro de copa (68,2 cm, figura 5.8B) fue mayor al fertilizar con TCA.

Asimismo, resultaron de interés las diferencias observadas en cuanto a la morfología de las hojas en base al sustrato donde crecieron las plantas, al tipo de fertilización que recibían y a la posición de la hoja en la planta. Tanto el tipo de sustrato, como el de fertilización y la posición de la hoja condicionaban la longitud y el diámetro del peciolo, así como el área y la biomasa foliar. Así, cabe destacar que el sustrato donde las plantas presentaban los mayores valores para cada variable

volvía a ser el suelo enmendado con IAS, que el fertilizante que más influía en cada uno de los parámetros determinado era el TCA y que aquellas hojas que ocupaban una posición inferior en la planta eran las que presentaban los mayores valores en los cuatro parámetros estudiados (Figura 5.9).

Además de la biometría, se analizó la concentración de clorofila y la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de las hojas, encontrándose que tanto el tipo de sustrato, como el tipo de fertilización, influyeron en ambos parámetros. En el caso de la cantidad de clorofila, los valores más altos de SPAD se observaron en el bancal arenoso fertilizado con TCA (71,9 en hojas de posición inferior, 71,4 en hojas intermedias y 69,8 en hojas de posición superior) y los más bajos en el bancal arcilloso fertilizado de forma convencional (50,5 en hojas de posición inferior, 47,6 en hojas intermedias y 50,2 en hojas de posición superior) (Figura 5.10). En el caso de la eficiencia cuántica máxima, los valores oscilaron entre $0,737 \pm 0,012$ de la fertilización convencional en el bancal arcilloso y $0,805 \pm 0,006$ de la fertilización con TCA en el bancal arenoso. En este último parámetro

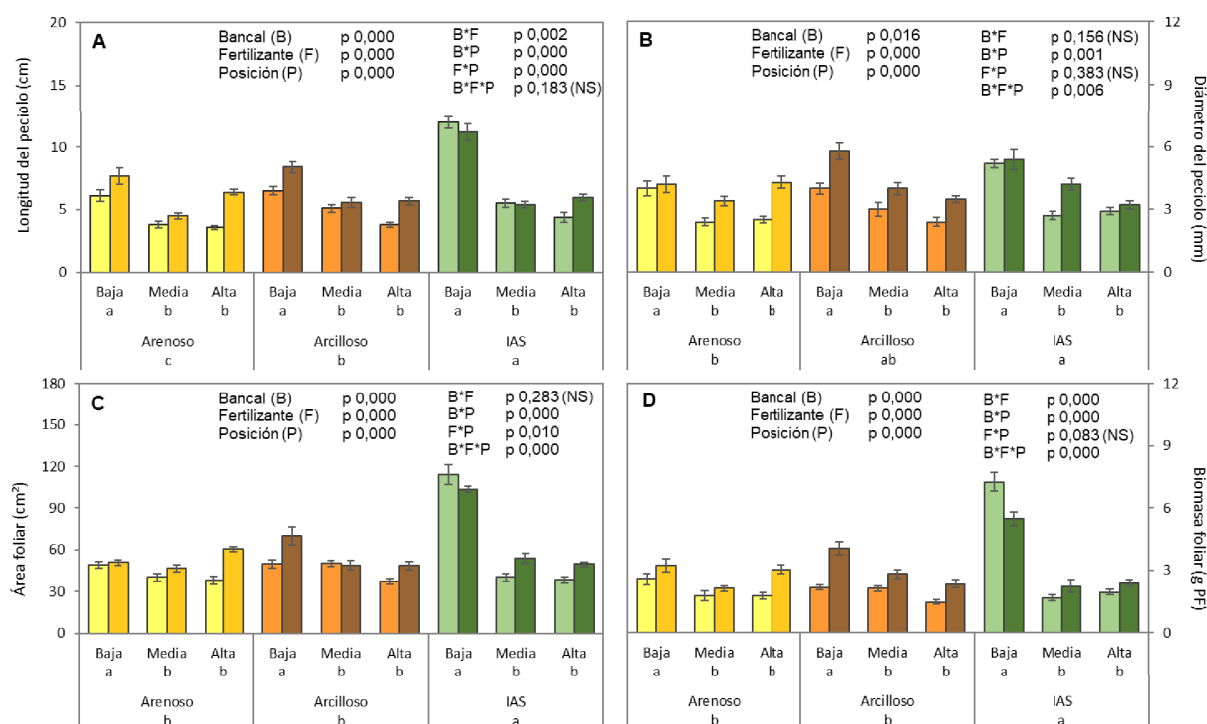


Figura 5.9. Biometría de la hoja según la posición a nivel de A) longitud del peciolo (cm), B) diámetro del peciolo (mm), C) área (cm²) y D) biomasa foliar (g Peso fresco) de las plantas de pimienta crecidas durante 6 meses en bancal arenoso, arcilloso y enmendado con IAS y fertilizados de forma convencional (color claro) y con TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) bajo los tratamientos indican diferencias significativas según el test *post hoc* y NS indica no significancia. Tamaño muestral n=6.

5. Valoración de la calidad del sistema suelo-plantas en función de la fertilización en condiciones de campo

tro, la posición de la hoja también influyó en el resultado, siendo mayor en aquellas hojas posicionadas en la zona baja o intermedia.

Se analizó, asimismo, el contenido en nutrientes de las hojas, encontrando que el único elemento que no presentó diferencias, ni en función del tipo de sustrato, ni

del tipo de fertilización fue el potasio. La concentración de todos los elementos analizados dependió, principalmente, del tipo de bancal en el que crecieron las plantas, a excepción del anteriormente mencionado potasio. Además, el tipo de fertilización influyó en la concentración de fósforo, hierro y zinc encontrada en las hojas. El efecto conjunto de sustrato y fertilizante

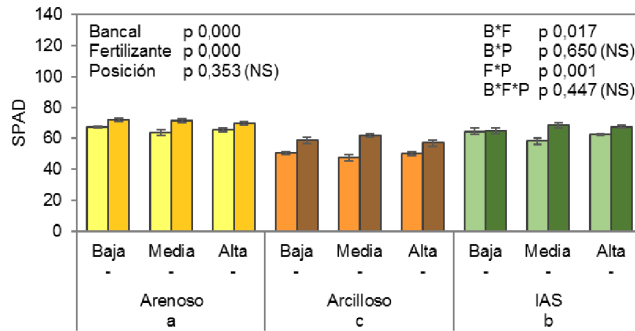


Figura 5.10. Contenido en clorofila de las hojas de pimienta según su posición en las plantas, tras 6 meses de crecimiento en bancal arenoso, arcilloso y enmendado con IAS y fertilizadas de forma convencional (color claro) y con TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) bajo los tratamientos indican diferencias significativas según el test *post hoc* y NS indica no significancia. Tamaño muestral n=10.

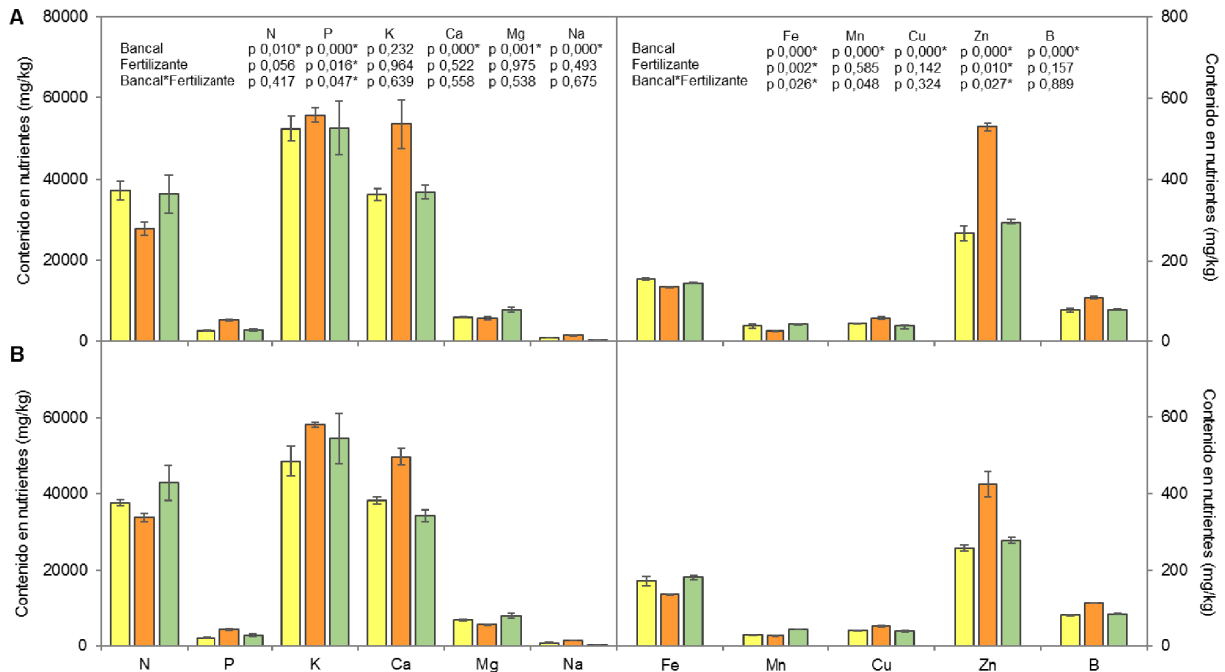


Figura 5.11. Contenido en nutrientes de las hojas de las plantas de pimienta sembradas en bancal arenoso (■), bancal arcilloso (■) y bancal enmendado con IAS (■), y crecidas bajo fertilización A) convencional y B) con TCA. Los asteriscos indican diferencias significativas según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=3.

5. Valoración de la calidad del sistema suelo-planta en función de la fertilización en condiciones de campo

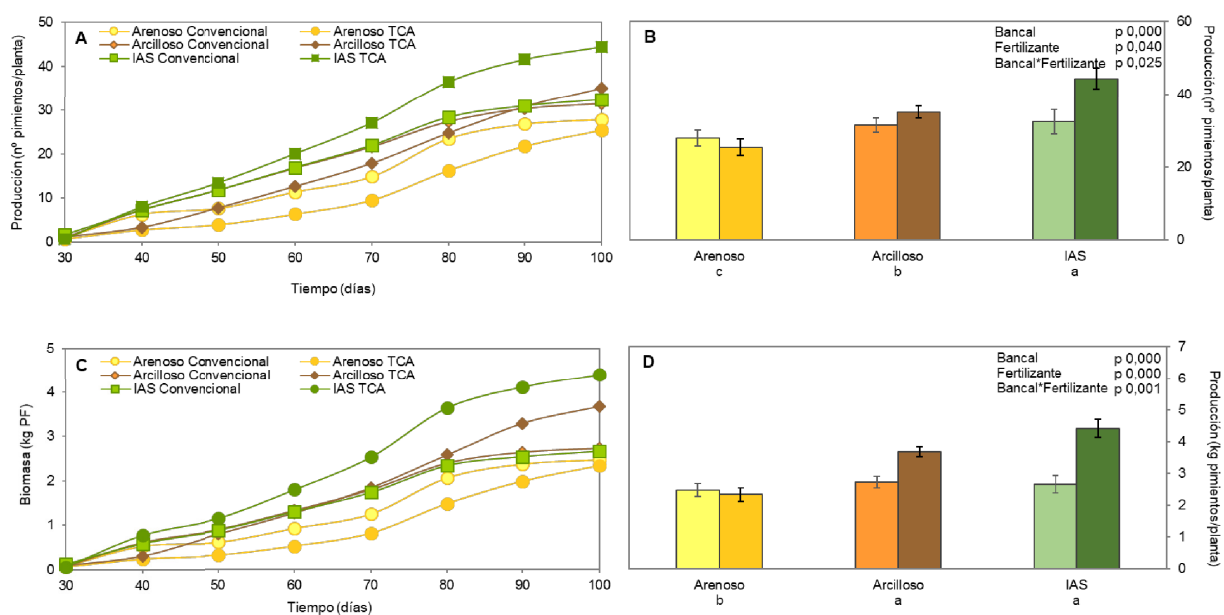


Figura 5.12. A) Producción continua y B) producción discreta a tiempo final, expresada como número de pimientos obtenidos por planta y C) producción continua y D) producción discreta a tiempo final, expresada como kilogramos de pimientos obtenidos por planta, crecida durante 6 meses en bancal arenoso, arcilloso y enmendado con IAS y fertilizada de forma convencional (color claro) y con TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) bajo los tratamientos indican diferencias significativas según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=20.

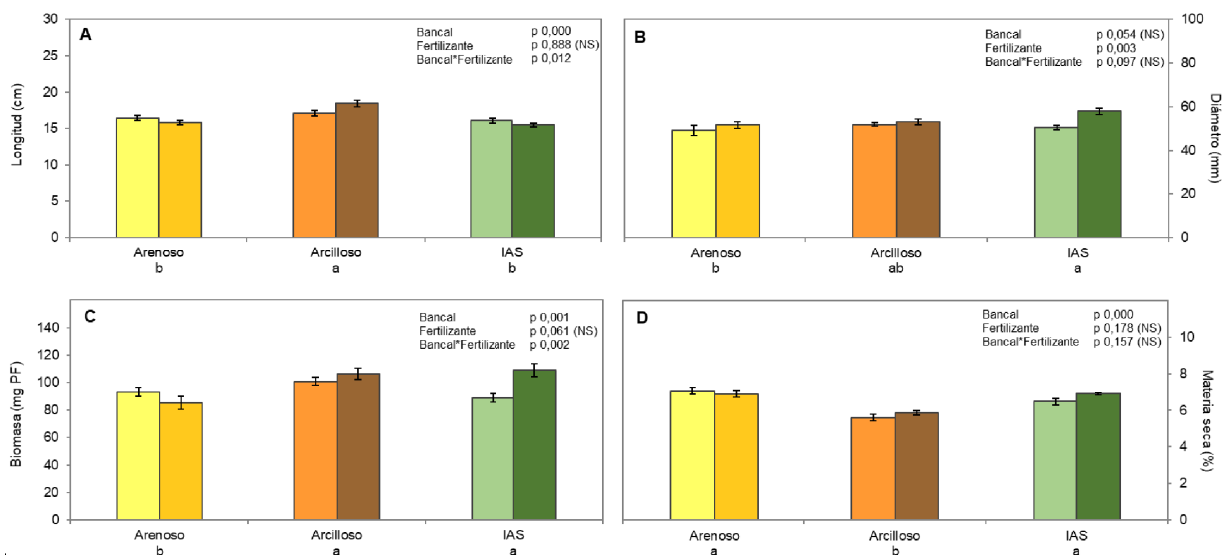


Figura 5.13. Biometría de los pimientos, expresada como A) longitud en centímetros, B) diámetro en milímetros, C) biomasa en gramos de peso fresco y D) porcentaje de materia seca, producidos en bancal arenoso, arcilloso y enmendado con IAS y fertilizados de forma convencional (color claro) y con TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) bajo los tratamientos indican diferencias significativas según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=20.

5. Valoración de la calidad del sistema suelo-planta en función de la fertilización en condiciones de campo

Tabla 5.3. Contenido en nutrientes y energético de los pimientos recogidos en los tres tipos de bancales (arenoso, arcilloso y enmendado con IAS) producidos bajo fertilización convencional y TCA. Tamaño muestral n=3.

	Arenoso		Arcilloso		IAS	
	Conv.	TCA	Conv.	TCA	Conv.	TCA
Humedad (%)	92,8 ± 0,1	93,0 ± 0,0	93,3 ± 0,1	93,2 ± 0,0	93,3 ± 0,1	93,1 ± 0,0
Grasa (%)	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Proteínas (%)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Cenizas (%)	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Hidratos de Carbono (%)	4,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,4 ± 0,2	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1	5,1 ± 0,2
Polifenoles (%)	0,140 ± 0,010	0,145 ± 0,005	0,145 ± 0,005	0,180 ± 0,010	0,140 ± 0,010	0,170 ± 0,010
Energía (Kcal/100g)	30,2 ± 0,3	30,0 ± 0,8	26,6 ± 1,1	30,9 ± 0,7	28,1 ± 0,8	28,6 ± 1,4

sólo fue relevante en la concentración de fósforo y zinc. Las plantas crecidas en el bancal arenoso presentaron un alto contenido, en general, en nitrógeno y hierro; las crecidas en suelo arcilloso, en fósforo, calcio, sodio, cobre, zinc y boro y las crecidas en suelo con IAS, en nitrógeno, magnesio, hierro y manganeso (Figura 5.11).

5.1.5. Producción

En cuanto a la eficiencia del cultivo, la mayor producción acumulada, en número de pimientos por planta, se observó en el bancal IAS fertilizado con TCA (44 unidades/planta) y la menor en el bancal arenoso fertilizado con TCA (25 unidades/planta). En el bancal arcilloso se obtuvieron 35 unidades por planta en aquellas fertilizadas con el té de compost frente a las 31 obtenidas en las fertilizadas de forma convencional. Es de destacar que, en el bancal enmendado con IAS, la aplicación del bioinsumo líquido mejoró significativamente la producción, obteniéndose 12 pimientos más

por planta que en las crecidas bajo fertilización convencional (32 unidades/planta) (Figuras 5.12A y B). En cuanto a la biomasa, se repite el mencionado patrón, incrementándose aún más las diferencias entre fertilización convencional y con TCA (Figuras 5.12C y D). Así, la mayor producción acumulada en biomasa se dio en el bancal enmendado con IAS y fertilizado con el bioinsumo (4,4 kg de pimiento/planta) y la menor en el bancal arenoso con TCA (2,3 kg de pimiento/planta). En el bancal arcilloso la planta fertilizada con té de compost proporcionó 3,7 kg frente a los 2,7 Kg obtenidos bajo fertilización convencional, diferencia que aún fue mayor en el bancal enmendado con IAS (4,4 frente a 2,7 Kg de la fertilización convencional).

La caracterización biométrica de los pimientos en base a sus dimensiones y peso mostró que el tipo de fertilización influía principalmente en el diámetro, y que las diferencias se apreciaban en mayor medida en el sustrato enmendado con IAS, en el que la fertilización con

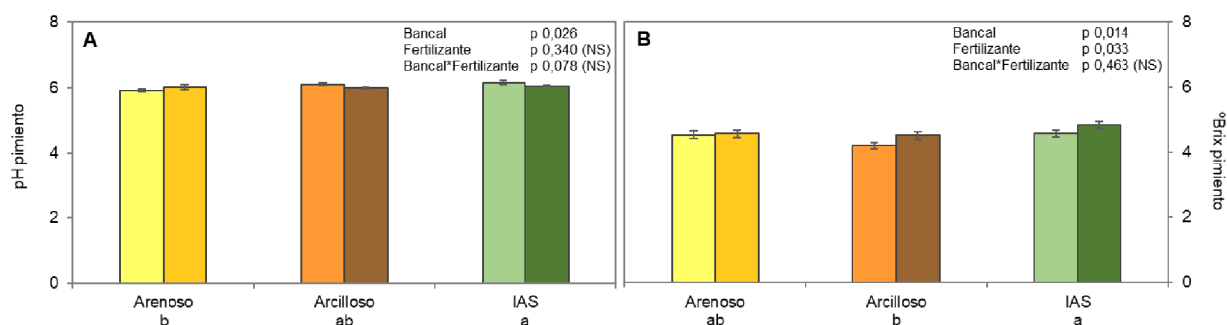


Figura 5.14. A) Acidez (expresada como pH) y B) contenido en carbohidratos solubles (expresado como grados Brix) de pimientos producidos por plantas crecidas durante en bancal arenoso, arcilloso y enmendado con IAS, fertilizados de forma convencional (color claro) y con TCA (color oscuro). Las letras (a, b, c) bajo los tratamientos indican diferencias significativas según el test *post hoc* y NS indica no significancia. Tamaño muestral n=10.

el bioinsumo proporcionó un incremento del 15% en diámetro, 23% en biomasa y 7% en el porcentaje de materia seca con respecto a la fertilización convencional (Figura 5.13).

Por otra parte, el grado de acidez y el contenido de azúcares solubles de los pimientos, dependió de nuevo del tipo de sustrato donde fueron cultivados, y, únicamente el contenido de azúcares dependió del tipo de fertilización. Los valores de pH oscilaron entre 5,9 y 6,2 de los pimientos crecidos en el bancal arenoso y bancal IAS, respectivamente, con fertilización convencional. Con respecto al contenido en azúcares, los pimientos procedentes de plantas cultivadas con té de compost presentaron un 4,6% más de azúcares que los pimientos fertilizados de forma convencional (Figuras 5.14A y B).

Finalmente, al analizar el contenido en nutrientes, el análisis estadístico reveló nuevamente que el factor sustrato influía en todos los parámetros analizados; sin embargo, ni el contenido en proteínas, ni el porcentaje de humedad fueron significativamente diferentes entre los dos tipos de fertilización. Los pimientos con mayor contenido en grasas, polifenoles y contenido energético fueron los presentados por los pimientos procedentes del bancal arcilloso tratado con TCA, los de mayor contenido proteico fueron los provenientes del bancal arenoso fertilizados de forma convencional, y los de mayor contenido en minerales y carbohidratos fueron los provenientes del bancal enmendado con IAS y fertilizados con TCA (Tabla 5.3).





6

Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

Para la valoración de la eficacia del ACT en la producción de planta forestal, se ha seleccionado como especie modelo el pino de monterrey (*Pinus radiata* D. Don), especie, que como ya se ha señalado, es de gran importancia forestal en el territorio. Además de valorar su influencia en el crecimiento de la planta, se ha analizado el estado físico-químico y biológico del suelo, así como la respuesta a la infección por el patógeno *Fusarium circinatum*.

6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUSTRATO

En la turba donde creció *P. radiata* se obtuvieron valores de pH de 8,3 en el caso de riego con agua, 8,0 con fertilización convencional y 8,1 con TCA (Figura 6.1A). Con respecto a la conductividad, se obtuvieron valores de 56,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en el caso del agua; 70,20 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con fertilizante convencional y 60,40 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en el caso del TCA (Figura 6.1B). El potencial de oxido-reducción de la turba fue homogéneo en los tres tratamientos, obteniéndose un promedio de $239 \text{ mV} \pm 12$.

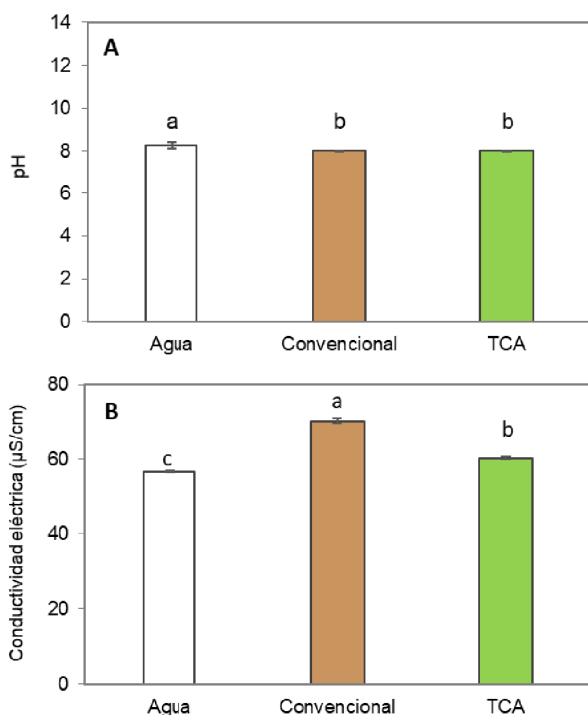


Figura 6.1. Valores de A) pH y B) conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del sustrato de cultivo de *P. radiata* en función del tipo de fertilizante. Las letras (a,b,c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc*. Tamaño muestral $n=3$.

Tabla 6.1. Resultados estadísticos de la ANOVA para las distintas actividades enzimáticas medidas en la turba de *P. radiata*, teniendo en cuenta el tipo de fertilización. Las siglas NS indican ausencia de significancia y los diferentes valores de las letras diferencias significativas, según el análisis *post hoc*.

	Agua	Convencional	IAL
Deshidrogenasa	b	b	a
Ureasa	a	b	a
Arilsulfatasa	NS	NS	NS
Fosfatasa ácida	a	b	a
Fosfatasa alcalina	a	b	a
β -Glucosaminidasa	b	a	a

6.2. ACTIVIDAD METABÓLICA DEL SUSTRATO

Los datos obtenidos de la medición de la actividad enzimática de estos mismos suelos, reveló que los tres tipos de fertilización estimulaban principalmente la fosfatasa alcalina y la ácida, seguida por la β -Glucosaminidasa, la arilsulfatasa, la ureasa y finalmente la deshidrogenasa (Figura 6.2), siendo significativamente mayores los valores de esta actividad enzimática en la turba fertilizada con TCA (Tabla 6.1).

6.3. PERFIL METABÓLICO DEL SUSTRATO

La velocidad de aclimatación (VA) de las poblaciones bacterianas fue mayor en la turba regada con fertili-

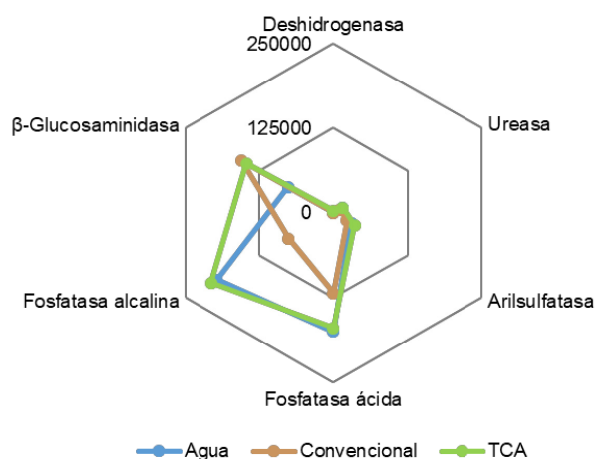


Figura 6.2. Actividad enzimática, medida en mg de sustrato $\cdot \text{kg}$ suelo $\text{seco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, para seis tipos de enzimas microbianas medidas en la turba de *P. radiata* y diferentes tipos de fertilización. Tamaño muestral $n=3$.

zante convencional (7,77) y con TCA (8,38), que con agua (2,46), no existiendo diferencias significativas entre la fertilización tipo NPK y TCA (Figura 6.3A). Tampoco se encontraron diferencias en el número de sustratos consumidos (NSU) entre la fertilización convencional (23) y la fertilización con TCA (24), pero sí con respecto al riego con agua (12) (Figura 6.3B). Donde sí se encontraron diferencias fue en la eficiencia del uso del nitrógeno (NUSE), siendo de un 34% en la fertilización con TCA, 28% en el riego con agua y 22% en el caso de la turba regada con fertilizante convencional (Figura 6.3C).

Por último, el estudio de la velocidad de metabolización de sustratos (VMS) reveló que, en este sustrato, se metabolizaban más rápidamente los ácidos carboxílicos, seguidos por los carbohidratos y los aminoácidos, y finalizando con los polímeros, las aminas y los compuestos fenólicos. La metabolización de los mismos ocurría de forma más lenta en la turba regada con agua, que en aquella regada con fertilizante convencional y TCA (Tabla 6.2).

6.4. EVALUACIÓN DE LA PLANTA PRODUCIDA EN VIVERO

El análisis de las características biométricas de las plantas después de 10 meses de crecimiento en vivero mostraron diferencias significativas en función del tipo de fertilización aplicado. Las plantas que menos crecieron fueron las que sólo recibieron agua, y las plantas regadas con fertilización convencional crecieron más en altura y diámetro y mostraron niveles más altos de biomasa de tallo y acículas. Sin embargo, según el índice de Dickson, las plantas de mayor calidad fueron

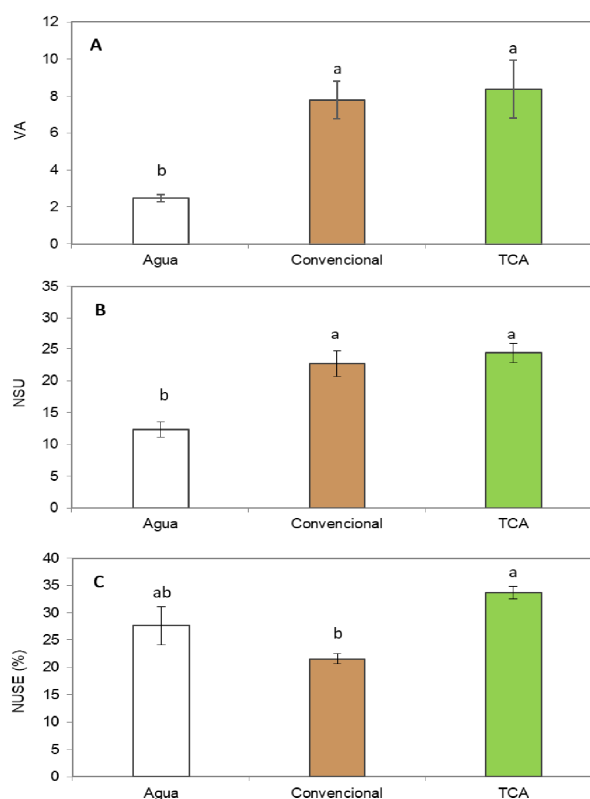


Figura 6.3. Velocidad de aclimatación (VA) tras 48 horas de incubación, B) número de sustratos utilizados (NSU) tras 8 días de incubación y C) eficiencia en el uso del nitrógeno (NUSE), expresado en porcentaje, tras 8 días de incubación del extracto de la turba de *P. radiata* con diferentes tipos de fertilización. Las letras (a,b,c) indican diferencias significativas en el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=3.

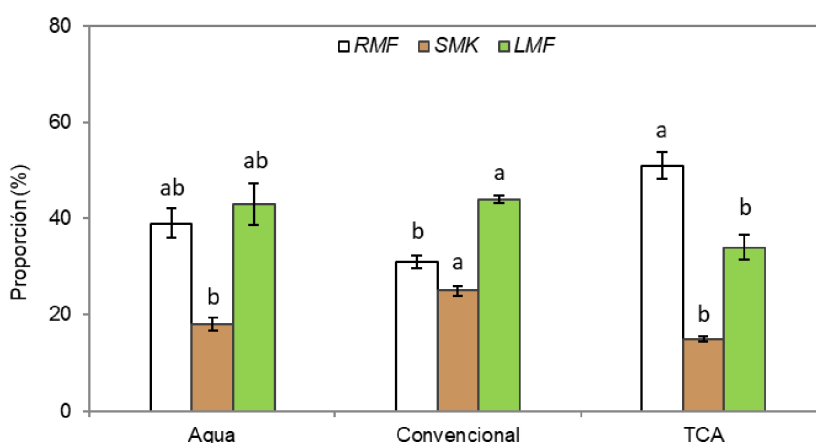


Figura 6.4. Proporción, en tanto por ciento, que representa cada una de las partes del pino (raíz - RMF, tallo - SMK y hojas - LMF) con respecto al peso seco total de la planta para cada uno de los diferentes tipos de fertilización. Las letras junto a los valores indican diferencias significativas según el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=10.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

Tabla 6.2. Velocidad de metabolización de los sustratos (VMS) tras 8 días de incubación de las poblaciones bacterianas de la turba de *P. radiata* con diferentes tipos de fertilización. Las letras junto a los nombres de los compuestos y los diferentes tipos de fertilización indican, según el análisis *post hoc*, el orden en el que son metabolizados. Tamaño muestral n=3.

		Ácido Carboxílico	Amina	Aminoácido	Carbohidrato	Comp. Fenólico	Polímero
		a	c	b	b	c	c
Agua	b	0,042 ± 0,000	0,019 ± 0,012	0,056 ± 0,014	0,060 ± 0,012	0,028 ± 0,014	0,032 ± 0,009
Conv.	a	0,181 ± 0,014	0,055 ± 0,014	0,097 ± 0,014	0,167 ± 0,024	0,042 ± 0,000	0,083 ± 0,024
TCA	a	0,194 ± 0,028	0,042 ± 0,000	0,125 ± 0,024	0,074 ± 0,026	0,056 ± 0,014	0,069 ± 0,014

Tabla 6.3. Características biométricas, Índice de Robustez (IR), ratio parte aérea-radical (A:R) e Índice de calidad de Dickson (ICD) de plantas de *P. radiata* tras 10 meses de crecimiento en vivero con diferentes regímenes de fertilización. Las letras junto a los valores indican diferencias significativas según el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=15.

	Altura (cm)	CR (mm)	Raíz (gPS)	Tallo (gPS)	Acículas (gPS)	IR	(A:R)	ICD
Agua	23,5 ± 0,4 c	2,9 ± 0,1 c	0,3 ± 0,0 c	0,2 ± 0,0 c	0,4 ± 0,1 c	2,6 ± 0,2 c	2,0 ± 0,5 b	0,08 ± 0,01 c
Conv.	63,8 ± 1,7 a	7,7 ± 0,4 a	1,5 ± 0,1 b	1,1 ± 0,1 a	2,0 ± 0,1 a	5,7 ± 0,4 b	2,2 ± 0,5 a	0,44 ± 0,02 b
TCA	48,1 ± 1,5 b	6,4 ± 0,2 b	2,5 ± 0,2 a	0,7 ± 0,0 b	1,7 ± 0,1 b	6,7 ± 0,2 a	1,0 ± 0,1 c	0,58 ± 0,03 a

Tabla 6.4. Contenido en pigmentos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso fresco), rendimiento cuántico del PSII (Fv/Fm), Área Foliar Específica (cm^2/g) y asimilación fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) de los pinos crecidos en turba para cada uno de los diferentes tipos de fertilización. Las letras junto a los valores indican diferencias significativas según el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=15.

	Clorofila a ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF)	Clorofila b ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF)	Carotenoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PF)	AFS (cm^2/g)	Fv/Fm	Asimilación fotosintética neta ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
Agua	2,93 ± 0,37 b	1,45 ± 0,09 b	1,32 ± 0,11 b	216,7 ± 16,3 a	0,679 ± 0,013 b	22,26 ± 1,90 b
Conv.	5,18 ± 0,35 a	2,14 ± 0,14 a	1,53 ± 0,08 ab	116,1 ± 2,8 b	0,693 ± 0,004 b	27,12 ± 1,84 b
TCA	5,89 ± 0,44 a	2,09 ± 0,15 a	1,84 ± 0,15 a	98,1 ± 4,5 b	0,756 ± 0,006 a	36,97 ± 2,52 a

las fertilizadas con TCA, ya que mostraron un aumento significativo de la biomasa radical y un crecimiento más equilibrado de la parte aérea (Tabla 6.3).

Las diferencias entre tratamientos volvieron a reflejarse al analizar el porcentaje que representaba cada uno de los órganos con respecto a la biomasa total de la planta medida como peso seco (Figura 6.4). Aquellas plantas regadas con TCA destacaban principalmente en biomasa radical (51%), seguidas por el riego solo con agua (39%) y por la fertilización convencional (31%). La proporción de tallo y acículas en la fertilización convencional fue de 25% y 44% y con TCA de 15% y 34% respectivamente.

El contenido en pigmentos fotosintéticos fue superior en la fertilización con TCA, mostrando mayor contenido en clorofila a, clorofila b y carotenoides que el resto de tratamientos, así como un mayor rendimiento cuántico

y tasa de asimilación fotosintética, a la par que mostraba una densidad de tejido en la acícula menor (Tabla 6.4).

En cuanto a la actividad de los enzimas implicados en la asimilación de nutrientes, se observó cómo la fertilización con TCA indujo una mayor actividad de la fosfatasa ácida ($87,76 \text{ nmoles de sustrato} \cdot \text{mg peso seco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), seguido por la fertilización convencional ($35,28$) y, finalmente, el riego solo con agua ($17,82$). En cuanto a la Fosfatasa alcalina, el mayor valor correspondió al riego con agua, seguido por la fertilización con TCA y la convencional ($6,35$, $5,92$ y $4,18 \text{ nmoles de sustrato} \cdot \text{mg peso seco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente) (Figura 6.5A). Por otra parte, la actividad Nitrato Reductasa se vio incrementada en raíz con la fertilización con TCA ($0,41 \text{ nmoles de sustrato} \cdot \text{mg peso seco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y con convencional ($0,29$) con respecto al riego con agua ($0,10$), mientras que, en hoja, la actividad enzimática fue mayor con la

fertilización convencional ($0,05 \text{ nmoles de sustrato} \cdot \text{mg peso seco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) que con la fertilización con TCA o sin fertilización ($0,03$ y $0,01$ respectivamente) (Figura 6.5B).

El contenido nutricional fue distinto entre tratamientos: La fertilización con TCA produjo un aumento significativo en el contenido de K. Este aumento fue del 40% en comparación con el riego con agua, y del 35% en comparación con la fertilización convencional. Por el contrario, en el caso del Zn, la fertilización convencional presentó el mayor contenido en sus tejidos, siendo un 25% más que en aquellos pinos regados con agua, y un 50% más que en los pinos fertilizados con TCA. Con respecto a los otros elementos, como P, Mg, S, Ca, Cu y Fe, la cantidad total no varió en función del tipo de fertilización, aunque en el caso del Mn la concentración fue mayor en las plantas sin fertilizar. Finalmente, el contenido de nitrógeno fue menor en las plantas regadas con agua, no existiendo diferencias entre fertilización convencional y TCA (Figura 6.6).

Antes de dar por terminado el crecimiento en fase de vivero, se analizó el sustrato donde crecieron estas plantas, encontrándose que aquellas fertilizadas de forma convencional, al igual que las crecidas con TCA, disponían de una mayor cantidad de potasio y magnesio, además de disponer de mayor contenido en calcio y fósforo. Ni el porcentaje de materia orgánica oxidable, ni el contenido en nitrógeno difirieron significativamente entre los tres tratamientos. Únicamente el tratamiento de riego con agua mostró un mayor contenido en porcentaje de materia seca (Tabla 6.5).

6.5. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DEL CRECIMIENTO DE *Fusarium circinatum*

Tras analizar las curvas de crecimiento para cada temperatura, se observó que *F. circinatum* a 15°C y a 25°C no presentaba fase *lag* y además experimentaba mayores tasas de crecimiento que a 4°C , 30°C y 35°C con un crecimiento de $3,3 \text{ mm/día}$ en el caso de ser incubado a 15°C y de $3,5 \text{ mm/día}$, a 25°C (Figura 6.7). Por esta

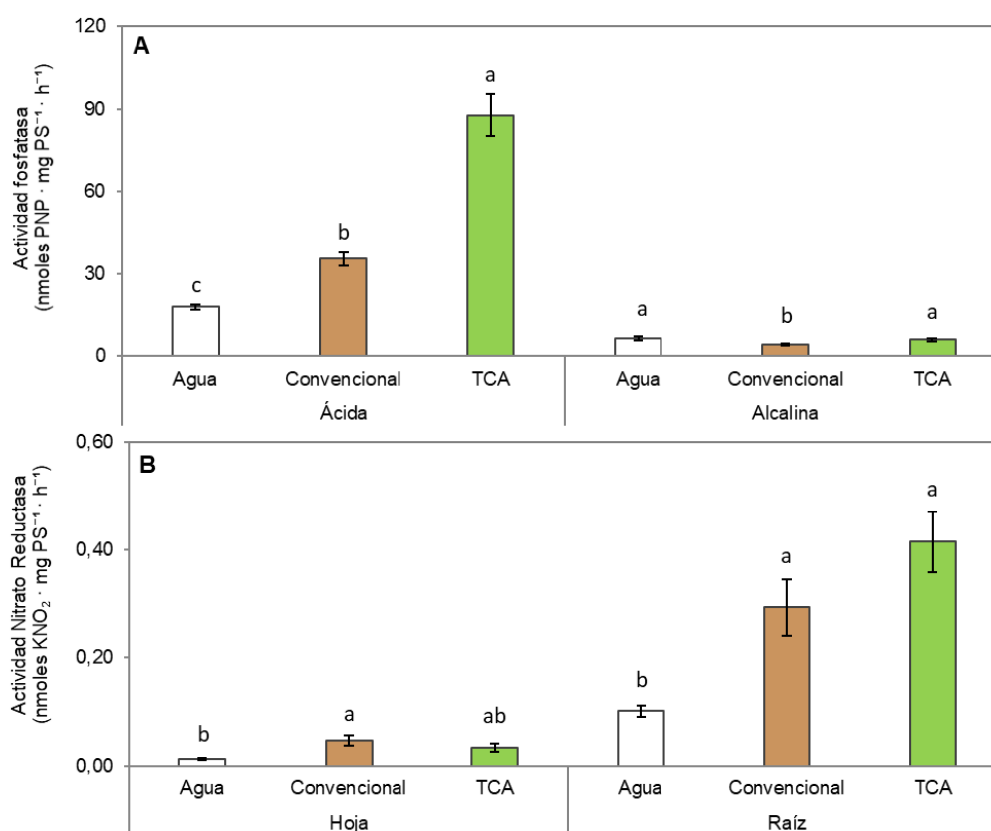


Figura 6.5. Actividad enzimática de *P. radiata* de A) Fosfatasa ácida (pH 5) y alcalina (pH 10) y B) Nitrato Reductasa en acícula y raíz, expresada en nmoles de sustrato \cdot mg peso seco⁻¹ \cdot h⁻¹. Las letras junto a los valores indican diferencias significativas según el análisis *post hoc*. Tamaño muestral n=8.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

Tabla 6.5. Contenido en materia orgánica y nutrientes de la turba donde crecieron las plantas de pino durante 9 meses con diferentes regímenes de fertilización. Tamaño muestral n=3.

	Agua	Convencional	TCA
Materia seca (%)	87,6 ± 0,2 a	86,7 ± 0,2 ab	86,4 ± 0,3 b
Materia orgánica oxidable (%)	78,4 ± 0,2 NS	79,8 ± 0,9 NS	79,6 ± 0,4 NS
Nitrógeno total (%)	0,9 ± 0,0 NS	1,0 ± 0,1 NS	1,2 ± 0,1 NS
Fósforo total (g/Kg)	0,3 ± 0,0 c	1,0 ± 0,1 a	0,7 ± 0,0 b
Potasio total (g/Kg)	0,7 ± 0,1 b	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a
Calcio (g/Kg)	36,3 ± 0,3 a	37,0 ± 0,6 a	32,0 ± 0,5 b

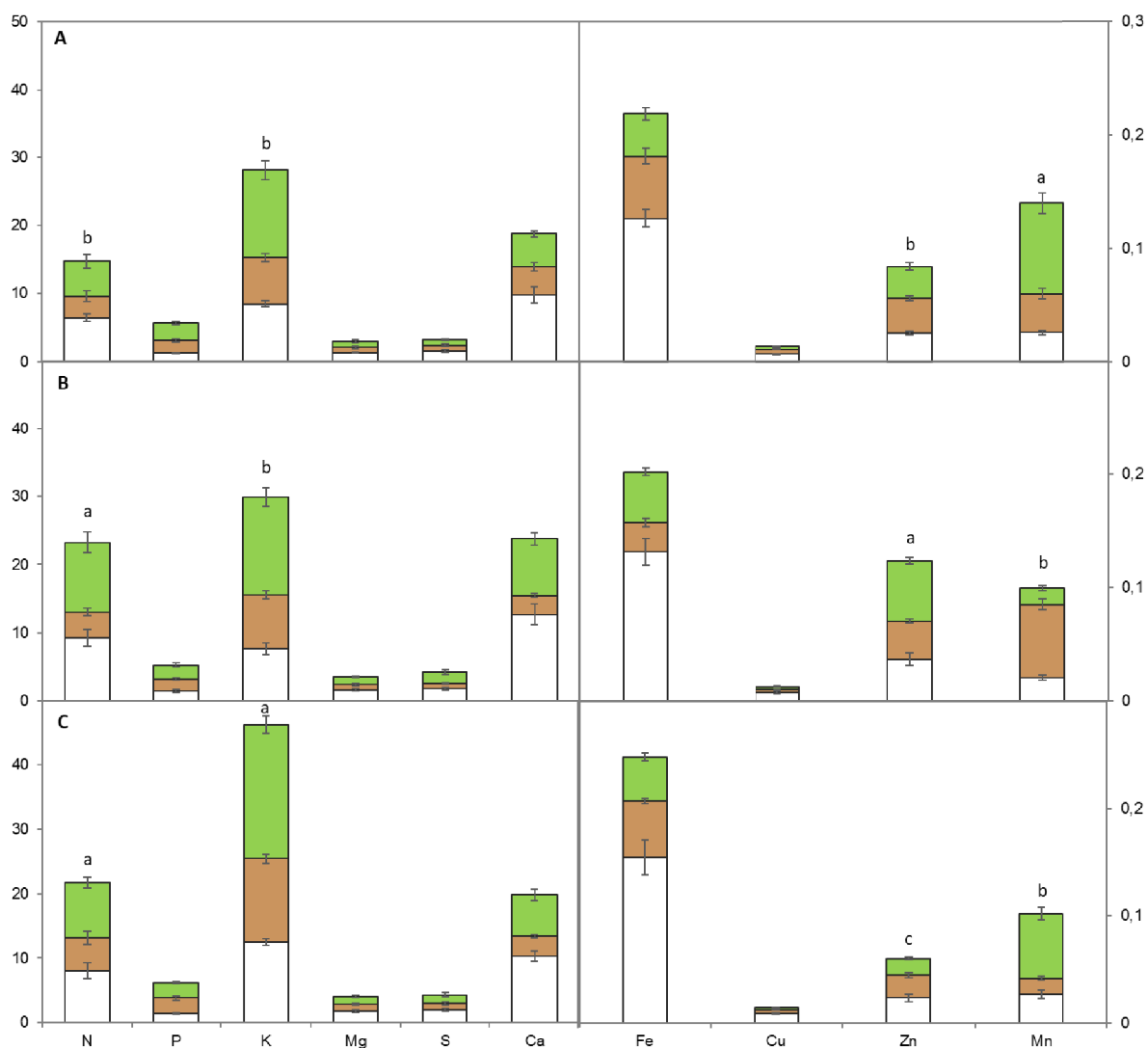


Figura 6.6. Contenido en macro (izquierda) y micronutrientes (derecha) medidos en g/Kg de acículas (verde), tallo (naranja) y raíz (blanco) de los pinos regados con A) agua, B) fertilizante convencional y C) TCA durante 10 meses. Tamaño muestral n=3.

razón, se eligió esta última temperatura para llevar a cabo los experimentos de incubación en PDA con distintas dosis de TCA y para los ensayos de infección de *P. radiata*.

Una vez determinada la temperatura óptima para llevar a cabo el ensayo, se evaluó su crecimiento en concentración creciente de TCA con el fin de determinar si se producía algún tipo de inhibición. El resultado fue que en todos los parámetros estudiados se observó una respuesta negativa frente a la concentración creciente de TCA. Así, con la aplicación de TCA al 25% se observó una inhibición en biomasa del 6%, en área del 32% y en germinación de esporas un 58%, incrementando además la producción de esporas en un 366%. Con la concen-

tración al 75% se observó un efecto inhibitorio mayor tanto en la biomasa de la colonia (25%) y su área (46%), como en la germinación de sus esporas (79%) y su producción 384% en comparación con el medio PDA sin TCA. Es de destacar que la mayor inhibición en biomasa y germinación de esporas (35% y 81% respectivamente) se dio con la concentración de TCA al 100% (Figura 6.8).

6.6. NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A *F. circinatum* EN FUNCIÓN DEL TIPO DE FERTILIZACIÓN EN VIVERO

Con respecto a la sintomatología de las plantas tras la inoculación del patógeno en el tallo, como se puede

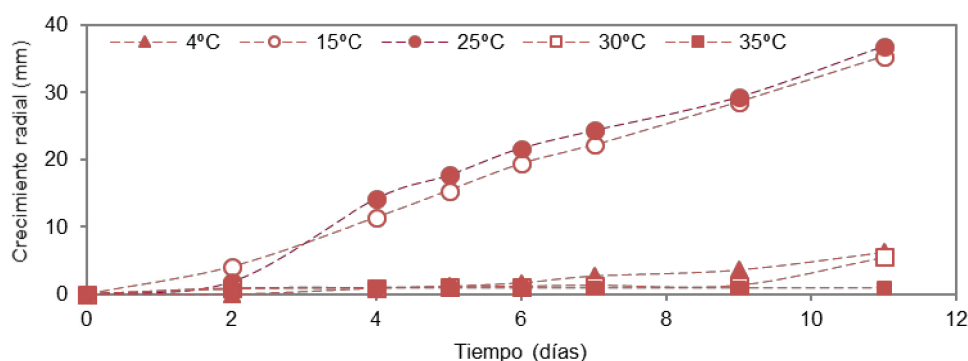


Figura 6.7. Tasa de crecimiento de *F. circinatum* en PDA a 4°C, 15°C, 25°C, 30°C y 35°C mantenidos durante 11 días en oscuridad. Tamaño muestral n=3.

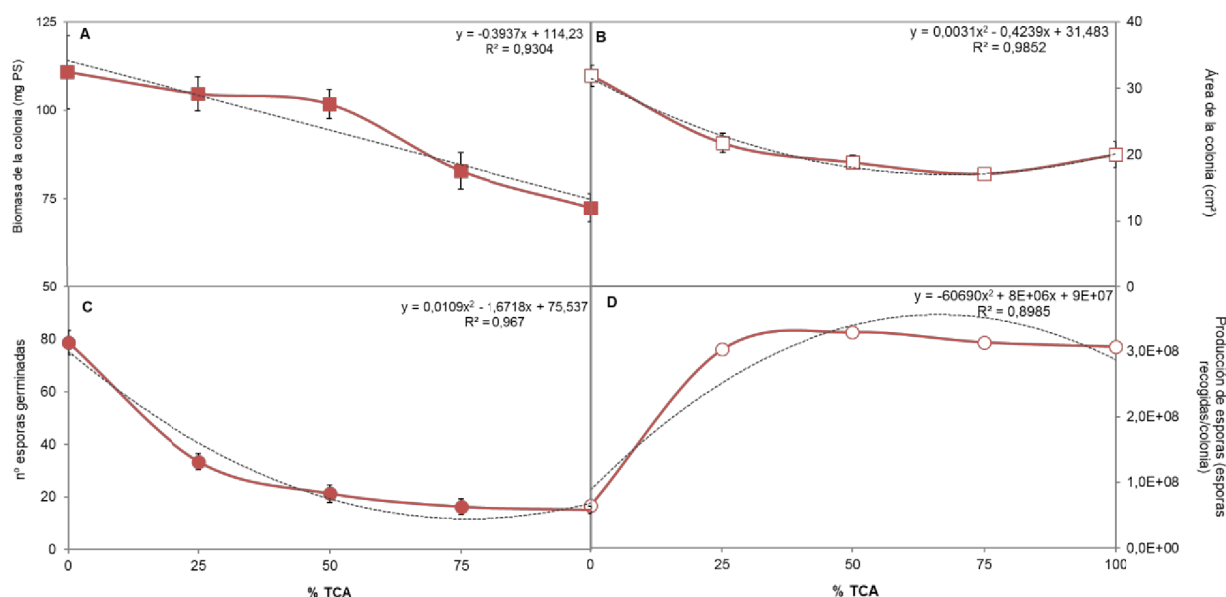


Figura 6.8. Efecto de la concentración creciente de TCA (0, 25, 50, 75 y 100%), aplicada al medio de cultivo sólido en placa Petri, en A) biomasa, B) área de la colonia, C) tasa de germinación de esporas y D) producción de esporas. Tamaño muestral n=5.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

observar en la Figura 6.9, en el caso de pinos de 10 meses, los síntomas tardaron 7 días en aparecer. A tiempo final del experimento, en aquellas plantas crecidas sólo con agua se produjo una mortalidad del 90%, permaneciendo únicamente un 10% de plantas asintomáticas. De la misma manera, en las plantas crecidas con fertilizante convencional, un 90% presentaron síntomas de muerte y un 10% necrosis en el punto de inoculación, quedando un 10% de plantas asintomáticas. Por último, entre aquellos pinos fertilizadas con TCA, un 73% presentaban signos de muerte, un 3% necrosis

en el punto de inoculación y un 23% no mostraron síntomas de infección. La resinación fue más acusada en plantas con fertilizante convencional, alcanzando un 73% una resinación moderada y un 3% una resinación elevada, frente al 53% de plantas con resinación moderada de la fertilización con TCA.

Al analizar la sintomatología observada en pinos de 18 meses, se pueden apreciar diferencias evidentes. Así, los síntomas comenzaron a ser visibles 35 días después de la infección, razón por la que se decidió alargar el

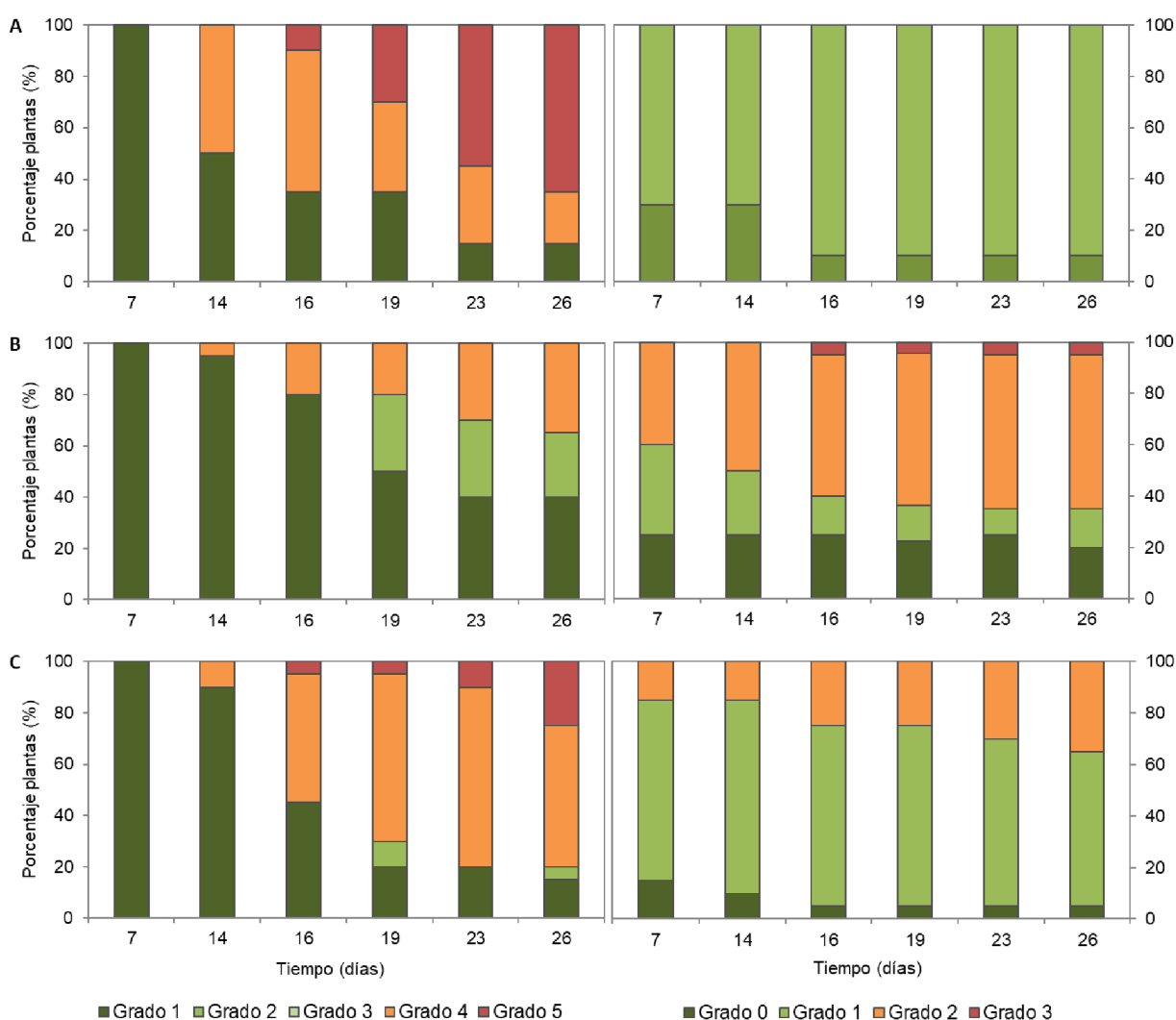


Figura 6.9. Sintomatología en base a grados de severidad de la planta (izquierda) y grado de resinación (derecha), observados tras la inoculación con *F. circinatum* de plantas de *P. radiata* de 10 meses crecidas en vivero con A) agua, B) fertilizante convencional y C) TCA. Síntomas de la escala de severidad: sano (grado 1), necrosis en el punto de la inoculación (grado 2), necrosis \pm 2cm más allá del punto de la inoculación (grado 3), marchitamiento (grado 4), muerto (grado 5). Escala para la exudación de la resina: bajo (grado 1), moderado (grado 2), \leq 5mm de la herida (grado 3), $>$ 4cm de la herida (grado 4). Tamaño muestral n=24.

experimento hasta los 98 días. Los síntomas más severos los mostraron las plantas de *P. radiata* regadas con agua con un 56% de mortandad, un 11% de marchitez y un 33% de plantas asintomáticas. A su vez, hay que destacar que las plantas fertilizadas de forma convencional fueron más severamente afectadas que aquellas fertilizadas con TCA. En el primer caso, se produjeron un 22% de muertes, además de un 67% de plantas marchitas y un 11% de plantas asintomáticas; en el segundo, es decir,

con TCA, se detectaron un 17% de plantas muertas, solo un 28% de plantas marchitas y un 50% de plantas asintomáticas. Asimismo, el volumen de resina exudada fue mayor en el caso de las plantas crecidas con fertilizante convencional, llegando a alcanzar un 50% de las mismas una resinación elevada, en comparación con la resinación observada bajo fertilización con TCA, que fue elevada solo en un 6% de la población (Figura 6.10).

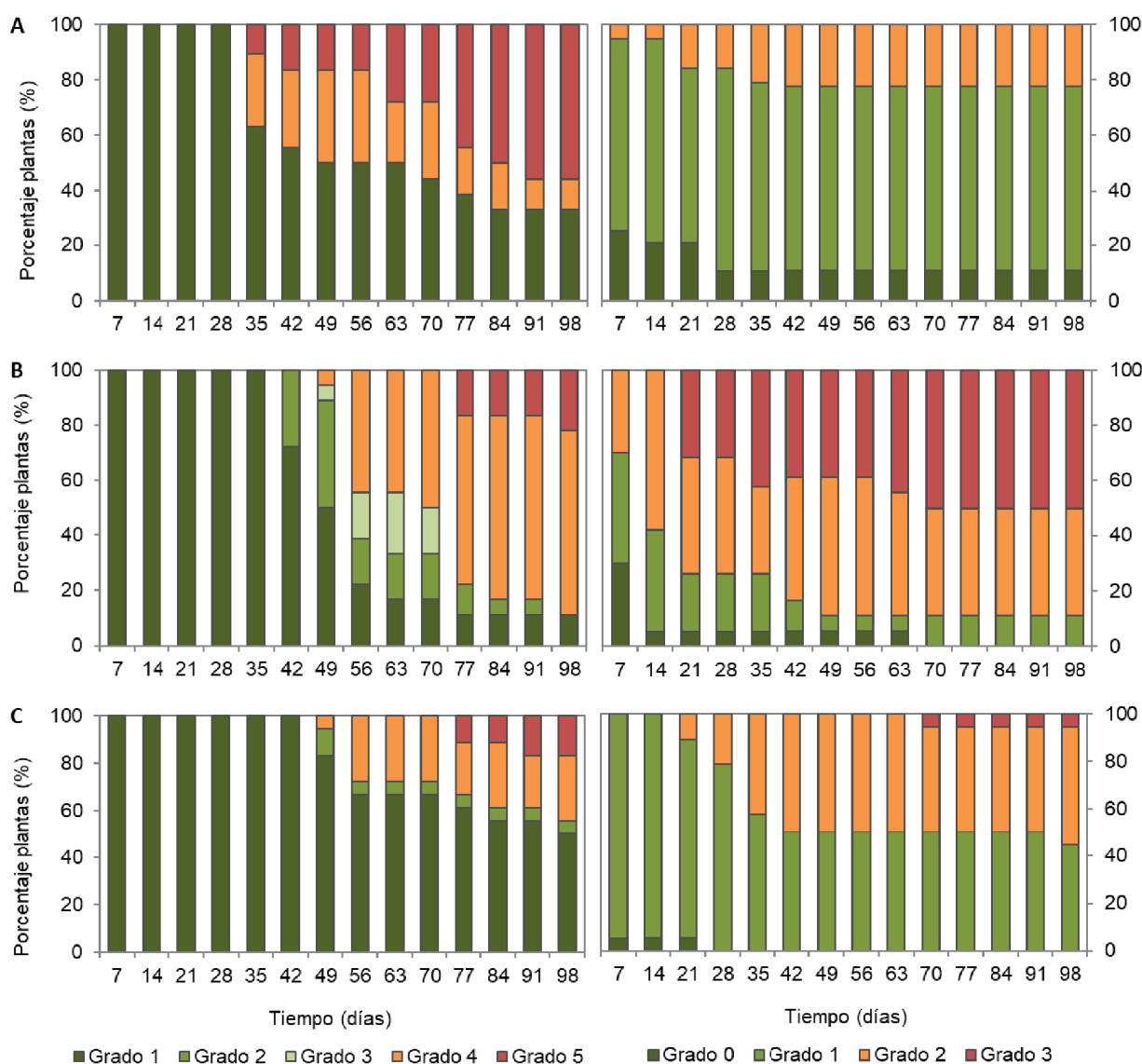


Figura 6.10. Sintomatología en base a grados de severidad de la planta (izquierda) y grado de resinación (derecha), observados tras la inoculación con *F. circinatum* de plantas de *P. radiata* de 18 meses crecidas en vivero con A) agua, B) fertilizante convencional e C) TCA. Síntomas de la escala de severidad: sano (grado 1), necrosis en el punto de la inoculación (grado 2), necrosis \pm 2cm más allá del punto de la inoculación (grado 3), marchitamiento (grado 4), muerto (grado 5). Escala para la exudación de la resina: bajo (grado 1), moderado (grado 2), \leq 5mm de la herida (grado 3), $>$ 4cm de la herida (grado 4). Tamaño muestral=24.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

Para comprobar el alcance real de la necrosis, se retiró la corteza de los tallos y se seccionaron tanto longitudinalmente, para comprobar el avance del chancro; como transversalmente, para determinar el área necrotizada. En la figura 6.11, aparecen las distintas longitudes que alcanzaron los chancros en pinos de 10 y 18 meses. En los primeros, no se observaron diferencias en la extensión de los mismos entre los pinos regados con agua (2,6 cm) y con fertilizante convencional (3,0 cm), pero sí con aquellos fertilizados con TCA (1,6 cm). Las diferencias fueron mayores en pinos de 18 meses, donde la longitud de los chancros fue mayor en pinos con fertilización convencional (3,8 cm), seguidos por aquellos regados con agua (2,9 cm) y con TCA (1,3 cm). Con respecto al área necrotizada en plantas de 10 meses, el mayor valor lo presentaron los pinos sintomáticos regados con agua, con un 76% del área necrotizada, seguidos por aquellas plantas sintomáticas con nutrición convencional (61%) y con TCA (57%). De entre

las plantas asintomáticas, un 49% de la superficie se encontraba necrotizada en pinos fertilizados de forma convencional, un 30% en los pinos regados con agua y un 26% en los pinos regados con TCA. Las diferencias fueron mayores, de nuevo, en el caso de los pinos de 18 meses: el tratamiento con agua exhibió la mayor área necrotizada (85%), seguido por la fertilización convencional (65%) y por la fertilización con TCA (48%) y de entre los pinos asintomáticos, aquellos fertilizados con TCA presentaron el menor porcentaje de tejidos afectados, un 18% (Figura 6.12).

La observación a la lupa y al microscopio óptico de estos tejidos, realizados hasta 3 cm por encima y por debajo del punto de inoculación, de pinos asintomáticos y sintomáticos con diferente grado de severidad, permitieron constatar la existencia de diferencias en el grado/nivel/intensidad de daño en función de la fertilización recibida por las plantas durante su fase de crecimiento en vivero.

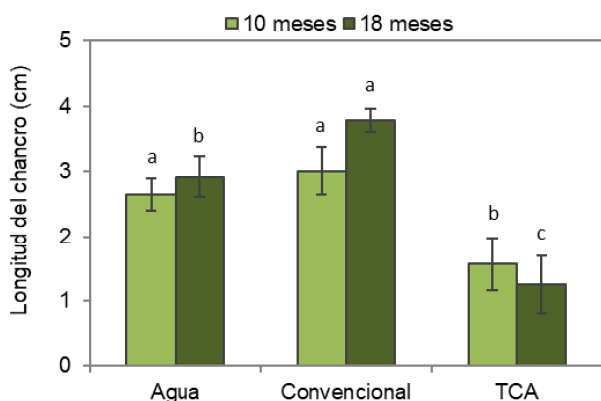


Figura 6.11. Longitud del chancro, en centímetros, observada tras la inoculación de *F. circinatum* en los tallos de los pinos de 10 y 18 meses. Tamaño muestral n=10.

Las figuras 6.13, 6.14 y 6.15 ilustran la progresión del patógeno *F. circinatum* a lo largo de la sección transversal de tallo de los pinos sintomáticos de 10 meses en los tres tratamientos: sin fertilizante (Figura 6.13), con convencional (Figura 6.14) y con bioinsumo (Figura 6.15) una vez transcurridos 20 días desde la inoculación. El punto de inoculación fue fácilmente detectable por el oscurecimiento del córtex y el floema, pudiéndose hacer el seguimiento de la progresión radial del patógeno gracias a la evidente secreción de resina desde el tejido xilemático hasta llegar a la médula. Asimismo, se observó que el hongo se propagaba, además, en forma perimetral a lo largo del xilema y el floema, desestructurando ambos tejidos a su paso y colapsándolos de resina.

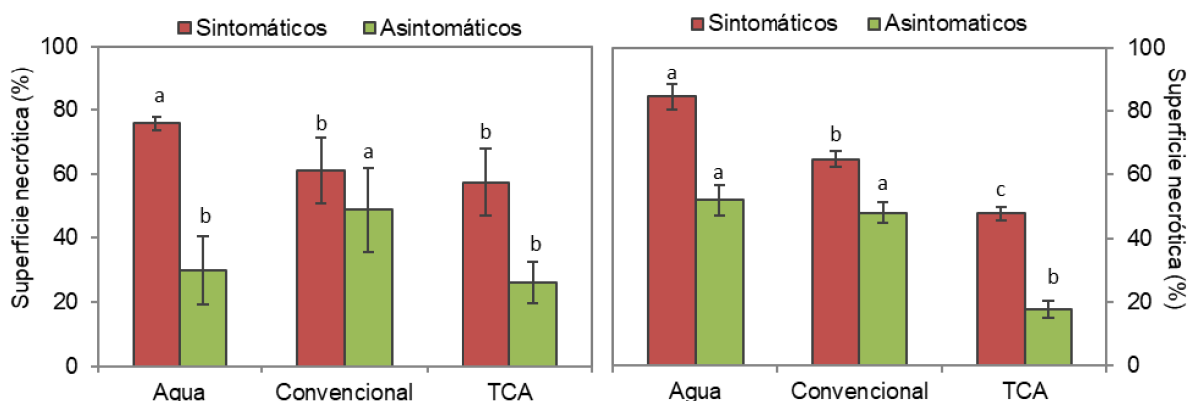


Figura 6.12. Porcentaje de superficie necrótica, calculada sobre secciones transversales de los tallos de los pinos inoculados con *F. circinatum*, de 10 (izquierda) y 18 (derecha) meses. Tamaño muestral n=18.

Las figuras 6.16, 6.18 y 6.20 ilustran la misma progresión transversal del patógeno *F. circinatum*, en este

caso, en pinos de 18 meses. Destacar la gran cantidad de resina exudada, mayor que en los pinos de

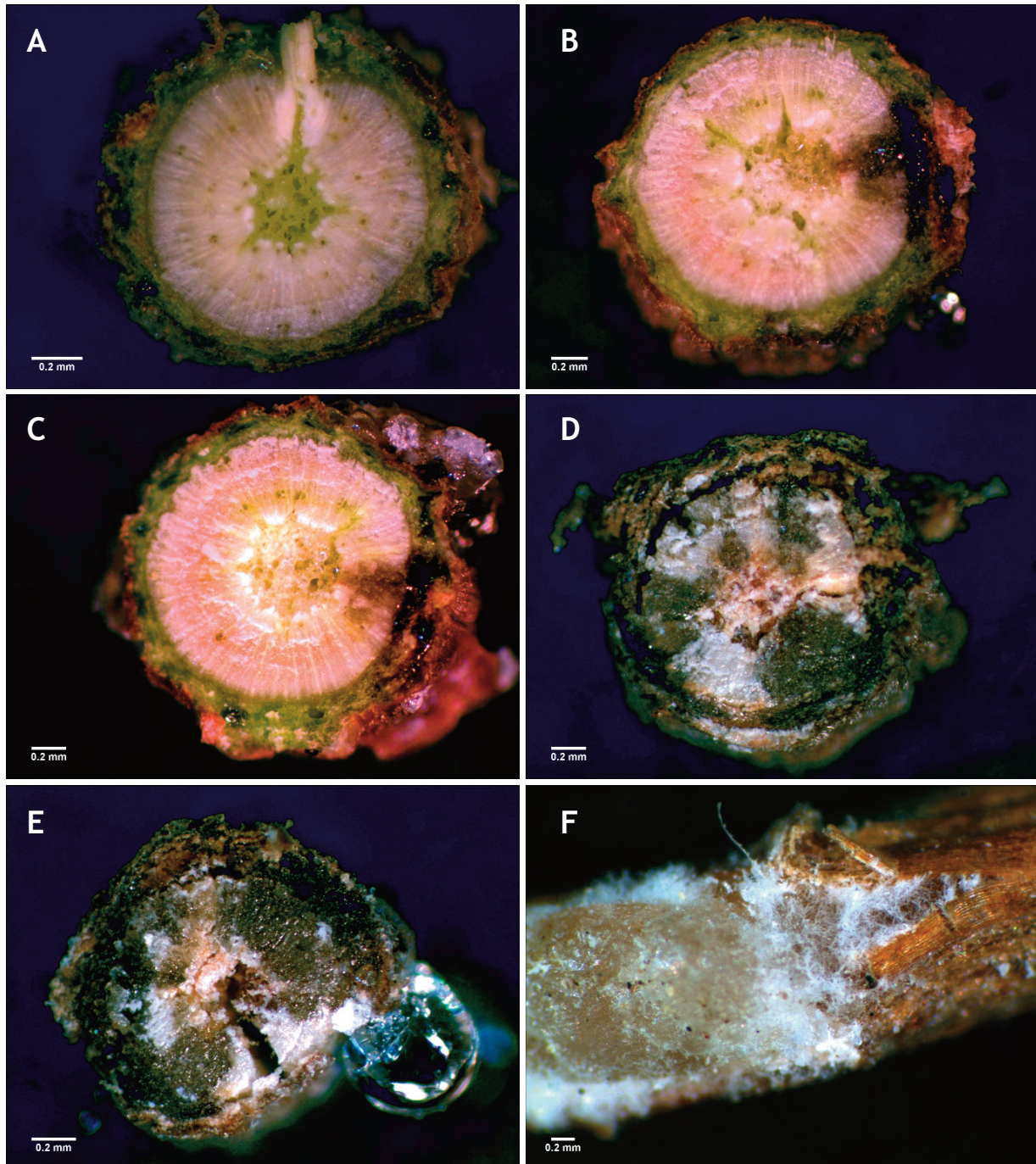


Figura 6.13. Pinos de 10 meses crecidos sin fertilización (tratamiento agua), transcurridos 20 días de la inoculación con *F. circinatum*. A) planta asintomática; B y C) plantas sintomáticas con necrosis en el punto de inoculación; D y E) plantas sintomáticas con necrosis ampliamente extendida en la sección del tallo; F) detalle de la resina exudada con micelio patógeno sobresaliendo bajo el córtex. Nótese la pérdida de integridad del tejido xilemático y de la médula cuando la infección se encuentra extendida.

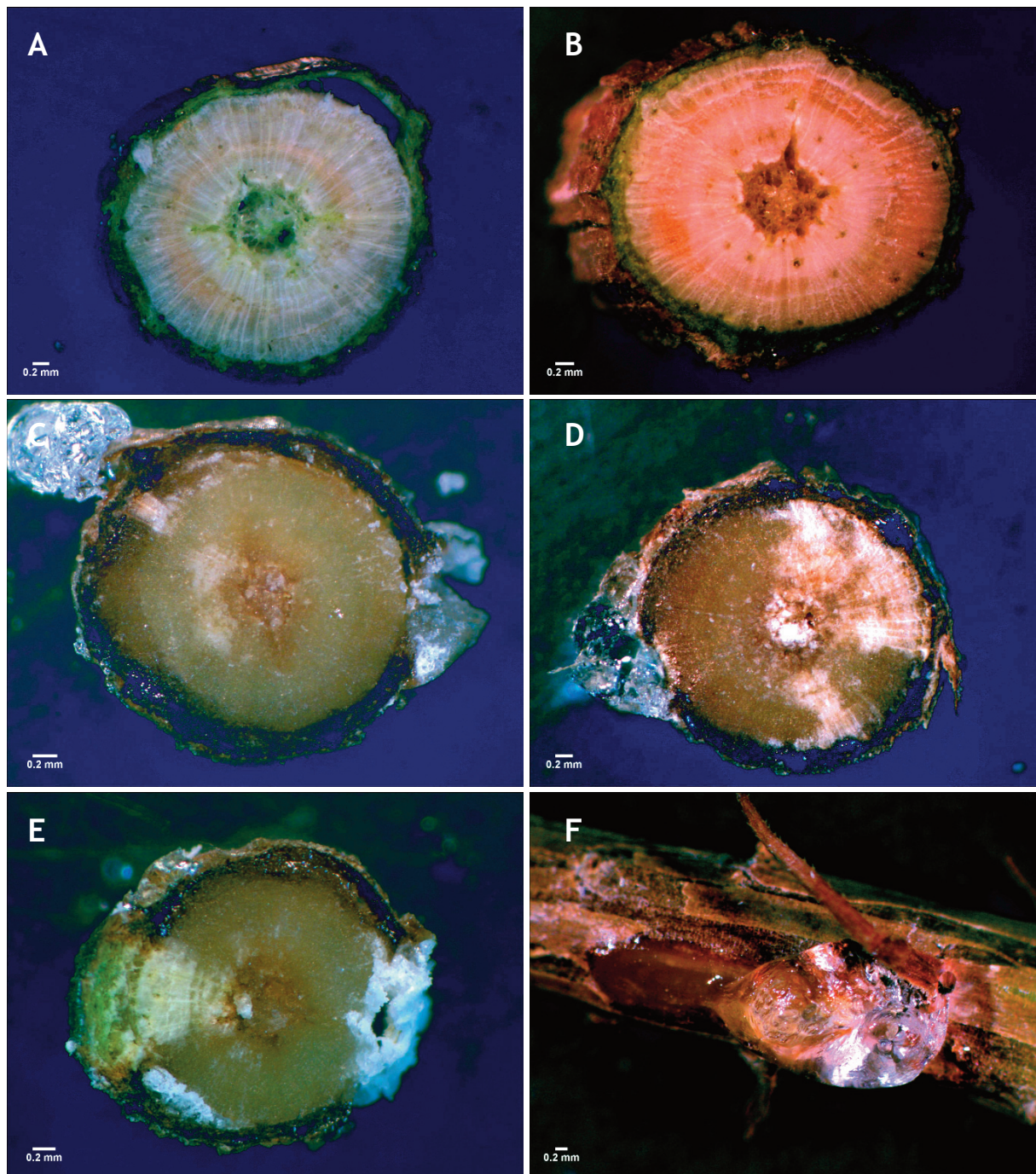


Figura 6.14. Pinos de 10 meses crecidos con fertilizante convencional, transcurridos 20 días de la inoculación con *F. circinatum*. A y B) plantas asintomáticas; C, D y E) plantas sintomáticas con necrosis presente en toda la sección del tallo, con resina polimerizada saliendo del tejido cortical; F) detalle de la resina exudada por el tallo con micelio patógeno sobresaliendo bajo el córtex, aunque en menor cantidad que en las plantas control. Nótese la pérdida de integridad del tejido xilemático y de la médula cuando la infección se encuentra extendida.

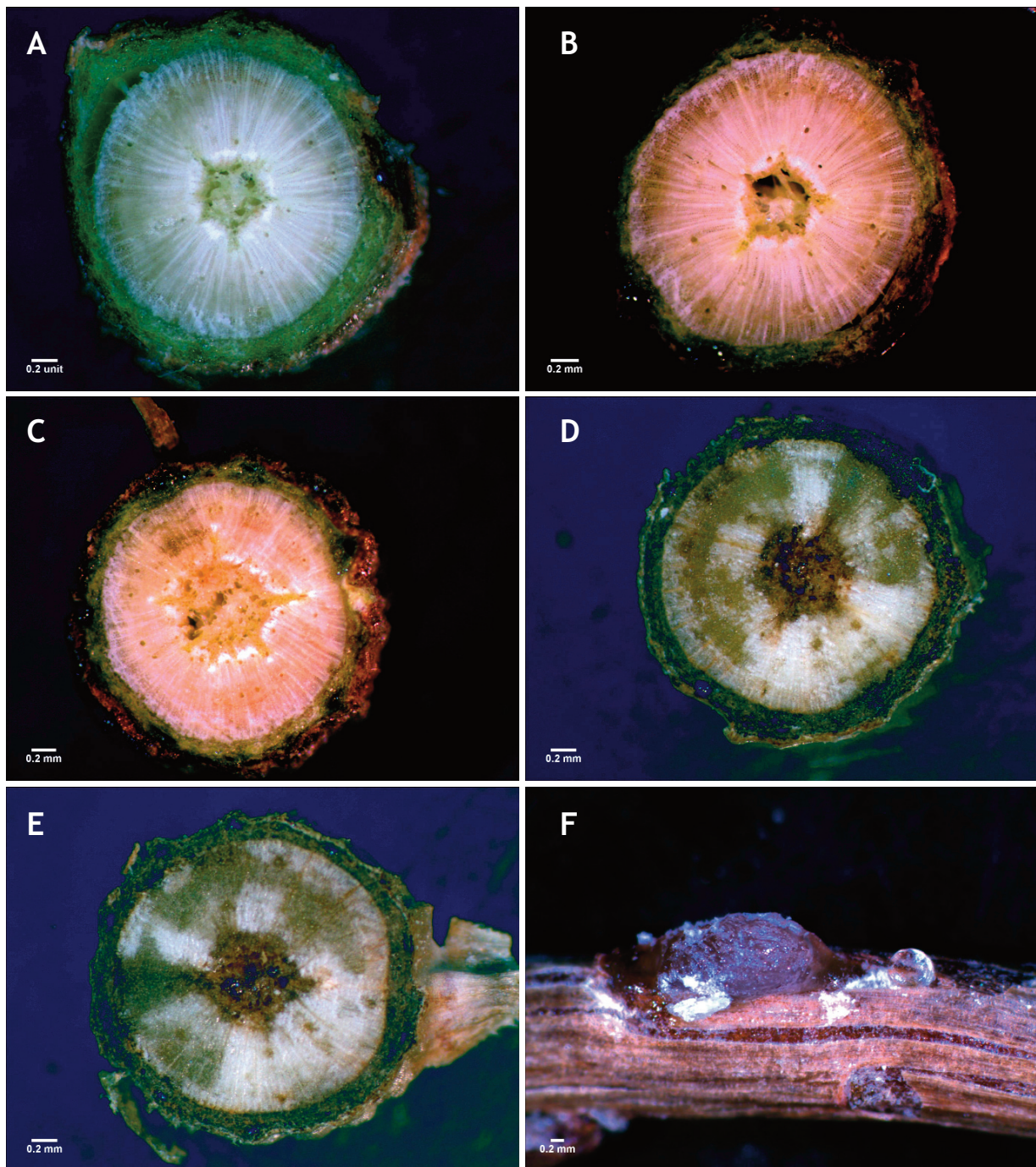


Figura 6.15. Pinos de 10 meses crecidos con TCA, transcurridos 20 días de la inoculación con *F. circinatum*. A) planta asintomática; B) planta asintomática con necrosis en los conductos resiníferos de la región inferior de la imagen; C) planta sintomática con necrosis en el punto de inoculación y en los conductos resiníferos de la región superior de la imagen; D y E) plantas sintomáticas con necrosis presente en gran parte de la sección del tallo; F) detalle de la resina exudada por el tallo con micelio patógeno sobresaliendo bajo el córtex, aunque en menor cantidad que en las plantas crecidas solo con agua o con fertilizante convencional. Nótese la pérdida de integridad del tejido xilemático y de la médula cuando la infección se encuentra extendida.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

menor edad, apreciándose un colapso de al menos la mitad de la sección del tallo. El objetivo de usar en este experimento una cepa de *F. circinatum* transfor-

mada fue corroborar, mediante microscopía confocal, que en los tejidos que se veían dañados bajo lupa y microscopía óptica se encontraba presente el hongo fito-

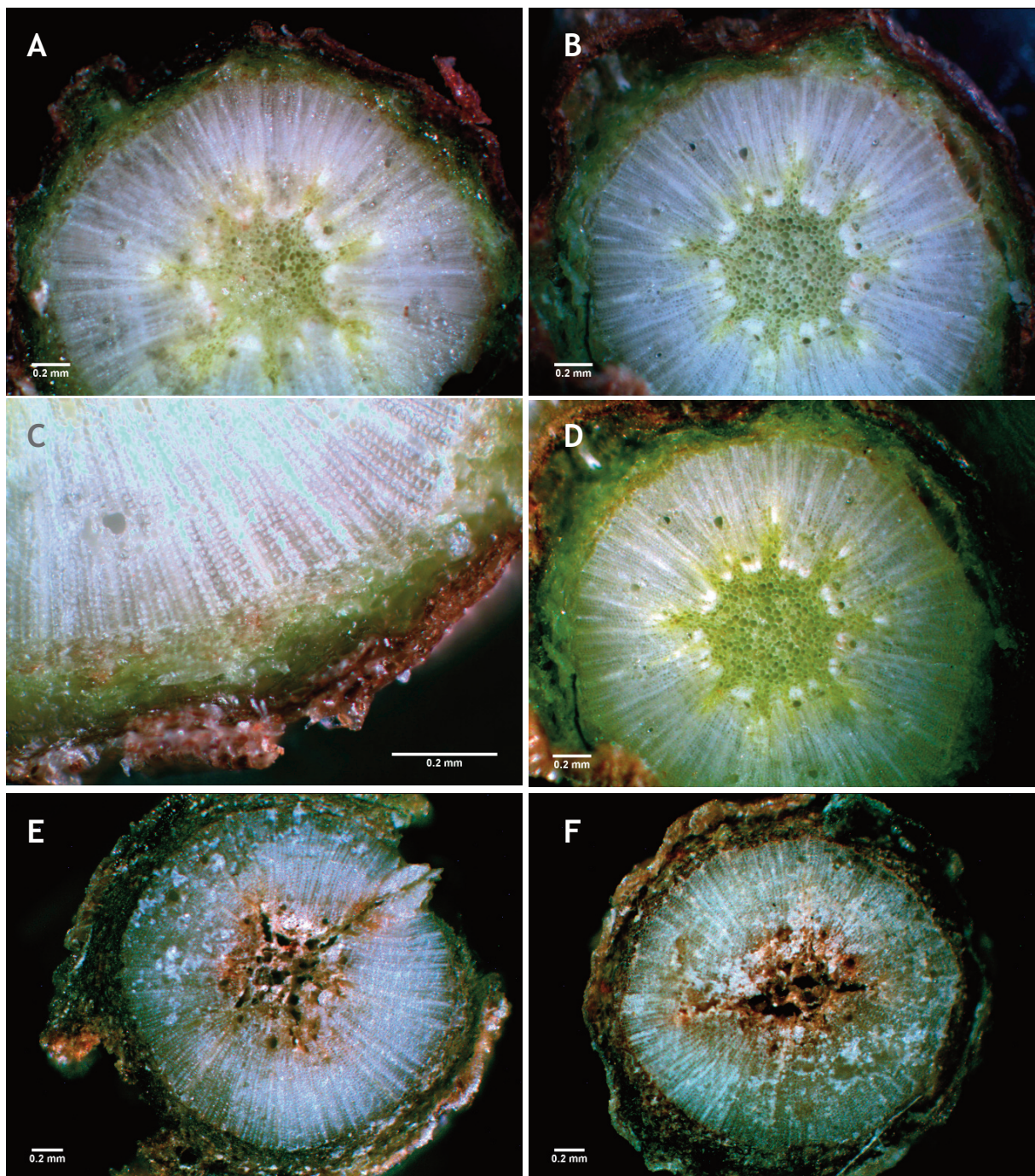


Figura 6.16. Pinos de 18 meses crecidos sin fertilización (tratamiento agua), transcurridos 35 días de la inoculación con *F. circinatum*. A, B, C y D) plantas asintomáticas; E y F) plantas sintomáticas. Nótese la pérdida de integridad del xilema y de la médula cuando la infección se encuentra extendida y del colapso de todo el tejido xilemático por la presencia de una ingente cantidad de resina.

patógeno, como agente causal de la degradación. En la figura 6.17A se puede distinguir el punto de inoculación, y las hifas de *F. circinatum* en el córtex, floema y xilema, incluso a lo largo de los radios medulares y circumbalando los conductos resiníferos (Figuras 6.17B y

D), así como que la sección izquierda del tallo quedó completamente colonizada por el patógeno, incluyendo la médula (Figuras 6.17B), que mostró una evidente pérdida de integridad. La figura 6.19A es especialmente llamativa, en la que se aprecia una menor fluorescencia

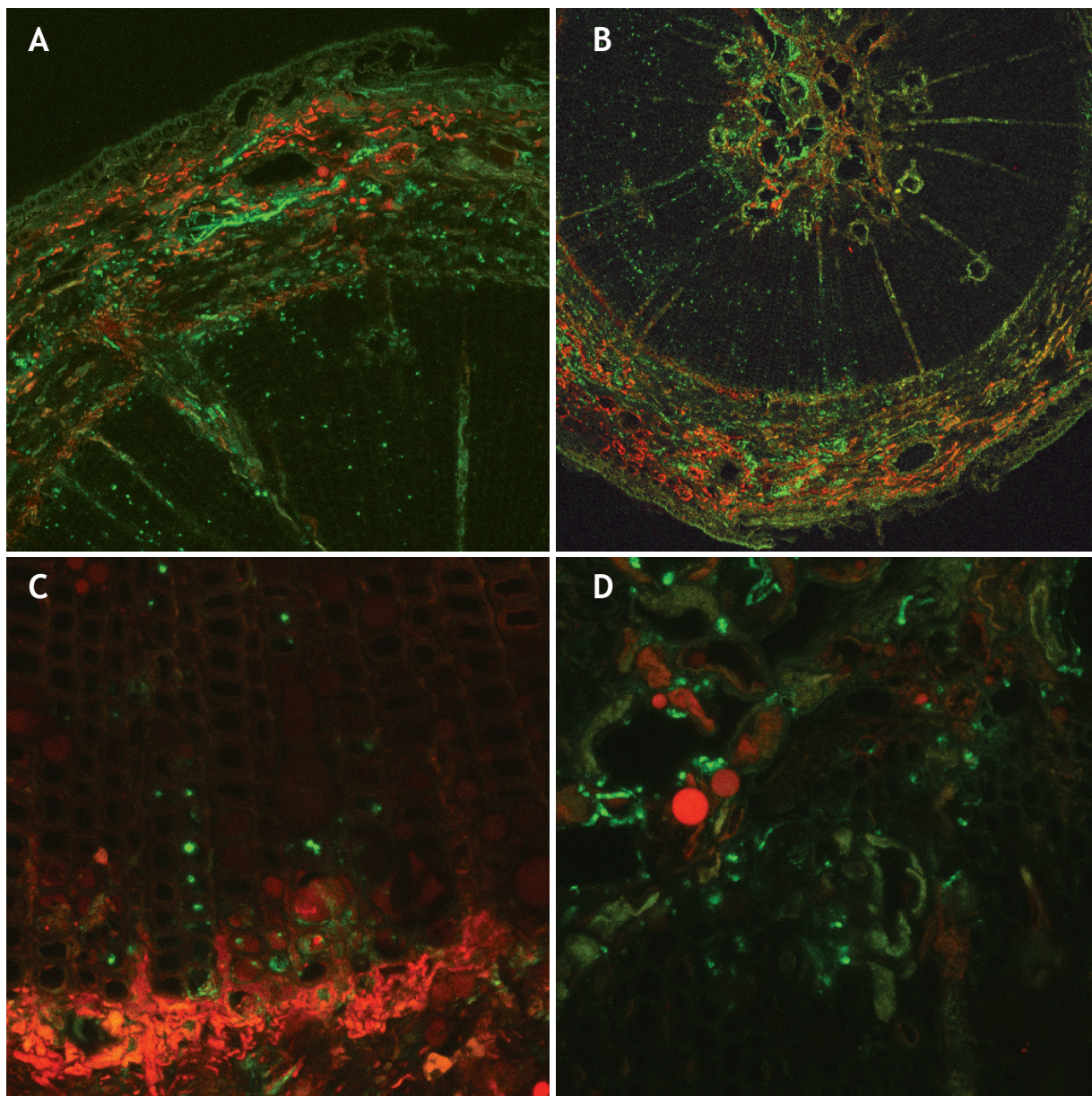


Figura 6.17. Pinos de 18 meses crecidos sin fertilización (tratamiento agua), observados bajo microscopio confocal, transcurridos 35 días de la inoculación con *F. circinatum*. A) ilustración del córtex y parte del xilema. *F. circinatum* se desarrolla entre las células corticales, rodeando los conductos resiníferos tanto del córtex, como del xilema y en los radios medulares; B) mitad inferior de la sección de pino con detalle de la médula. Se observa que el patógeno ha colonizado más intensamente la zona proximal a la inoculación de la sección transversal, incluida la médula; C) franja córtex-xilema y D) xilema-médula, con hifas de *F. circinatum* entre los espacios intercelulares.

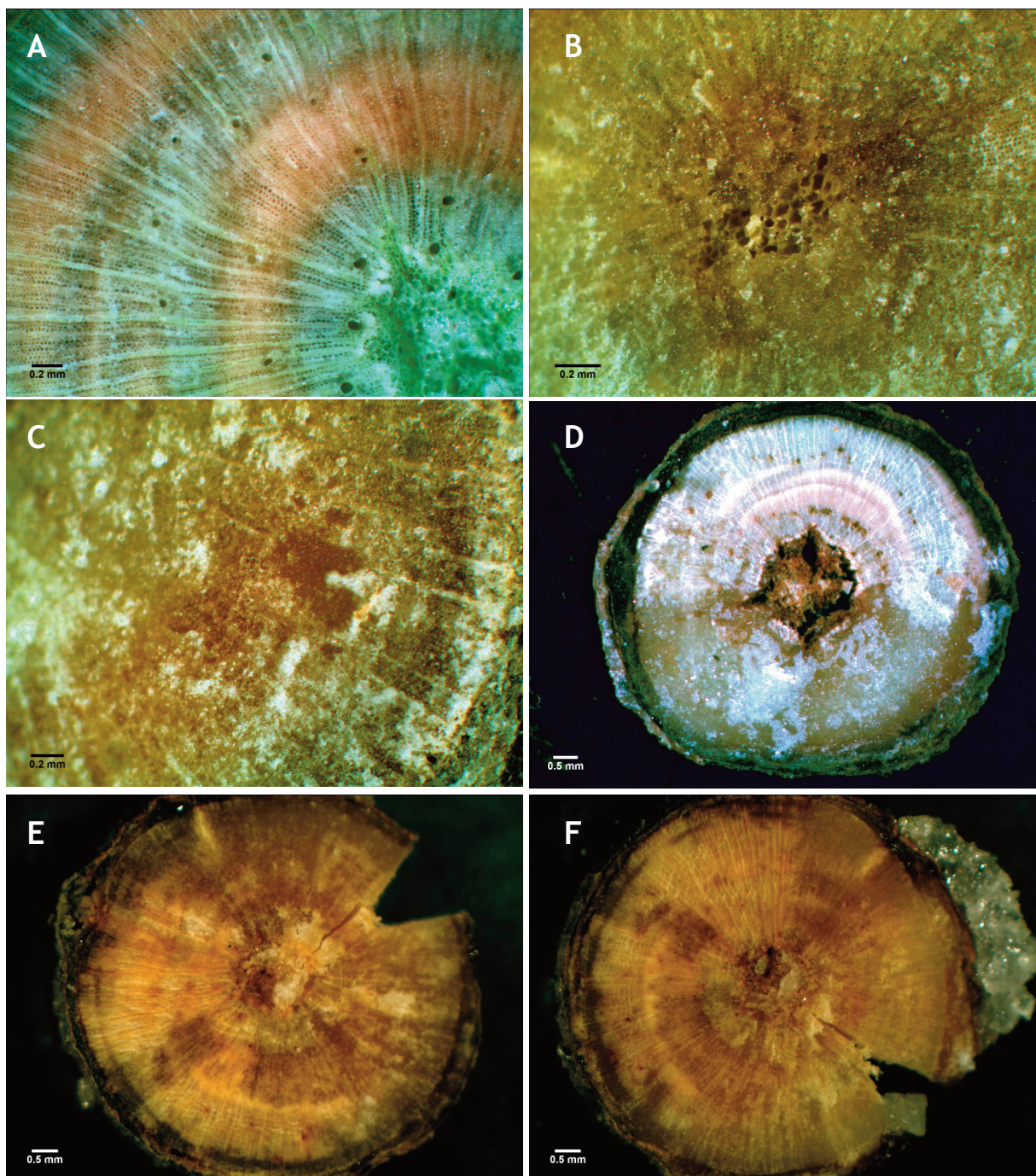


Figura 6.18. Pinos de 18 meses crecidos con fertilizante convencional, transcurridos 35 días (A-D) o 63 (E-F) de la inoculación con *F. circinatum*. A) planta asintomática; B y C) detalle de la médula, prácticamente desestructurada y rodeada de resina, y del xilema en plantas sintomáticas; D) Sección transversal del tallo, 1 cm por encima del punto de inoculación, en la que se aprecia el severo daño en el córtex y la destrucción total de la medula (corresponde a planta con ápice caído y marchitez de acículas); E y F) médula totalmente colapsada por resina y necrosis ampliamente extendida.

del tejido xilemático coincidente con el área colonizada por el patógeno. En las imágenes 6.19C y D se observa una gran colonización de córtex y médula, esta última viéndose especialmente desestructurada. La figura 6.21 muestra de nuevo presencia del patógeno en

el córtex, la colonización del xilema, incluso alrededor de los conductos resiníferos y una gran afección de la médula, causada por una elevada densidad de hifas. Una vez observadas estas diferencias en pinos de 18 meses, se determinó cuantificar la cantidad de hongo

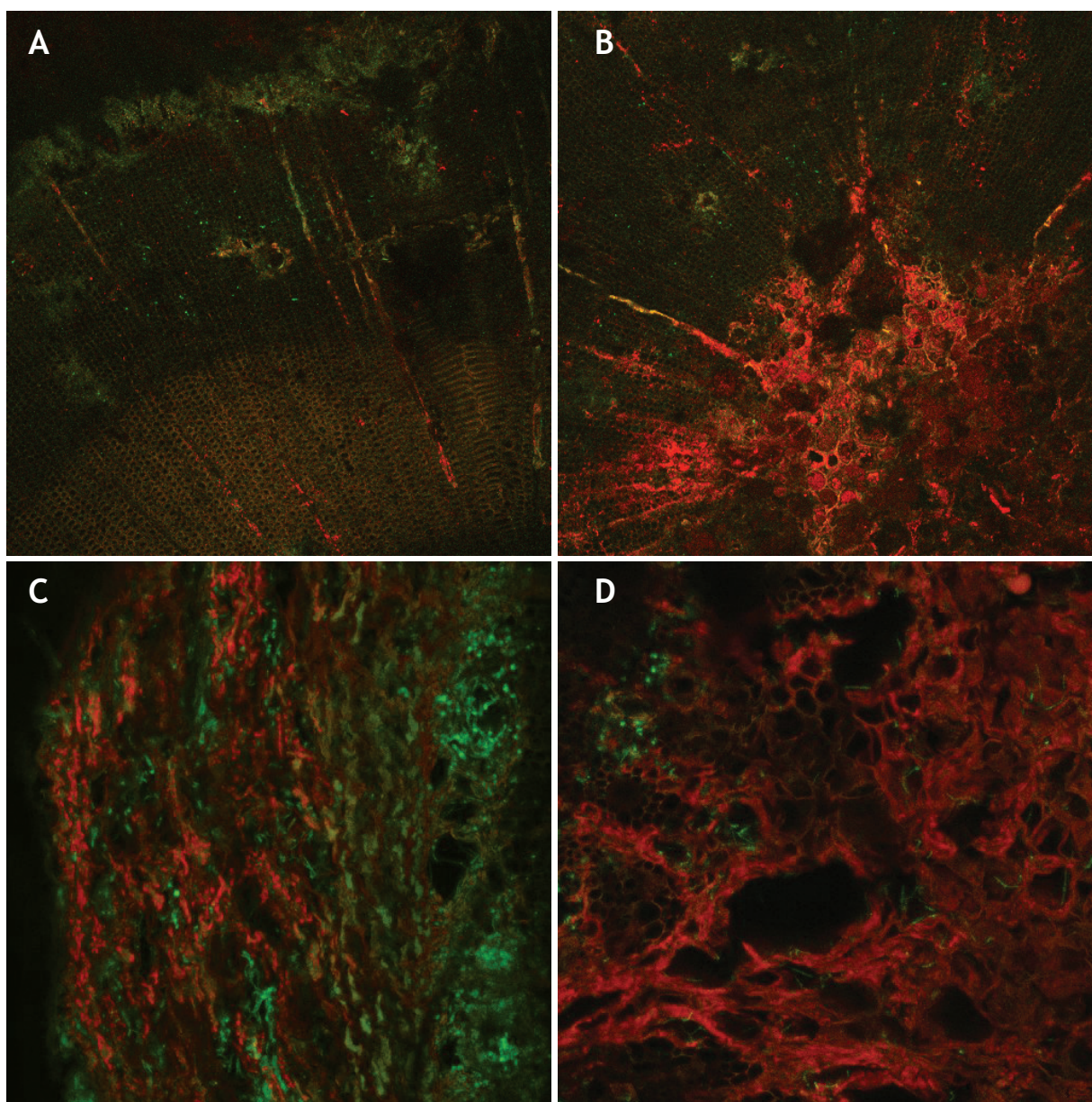


Figura 6.19. Pinos de 18 meses crecidos con fertilizante convencional observados bajo microscopio confocal. A) detalle de la franja de separación entre el córtex y el xilema tras 35 dpi. La parte superior se encuentra necrótica por la invasión tisular de *F. circinatum*, tanto entre las células xilemáticas, como rodeando los conductos resiníferos y a lo largo de los radios medulares; B) detalle del tejido xilemático que rodea a la médula tras 35 dpi. El patógeno ha alcanzado la médula, pero no la ha colonizado, C) aspecto de córtex y xilema tras 56 dpi. *F. circinatum* se extiende entre las células corticales y su densidad ha aumentado en el tejido xilemático; D) colonización de la médula por el patógeno a los 56 dpi, con evidente desestructuración de la misma.

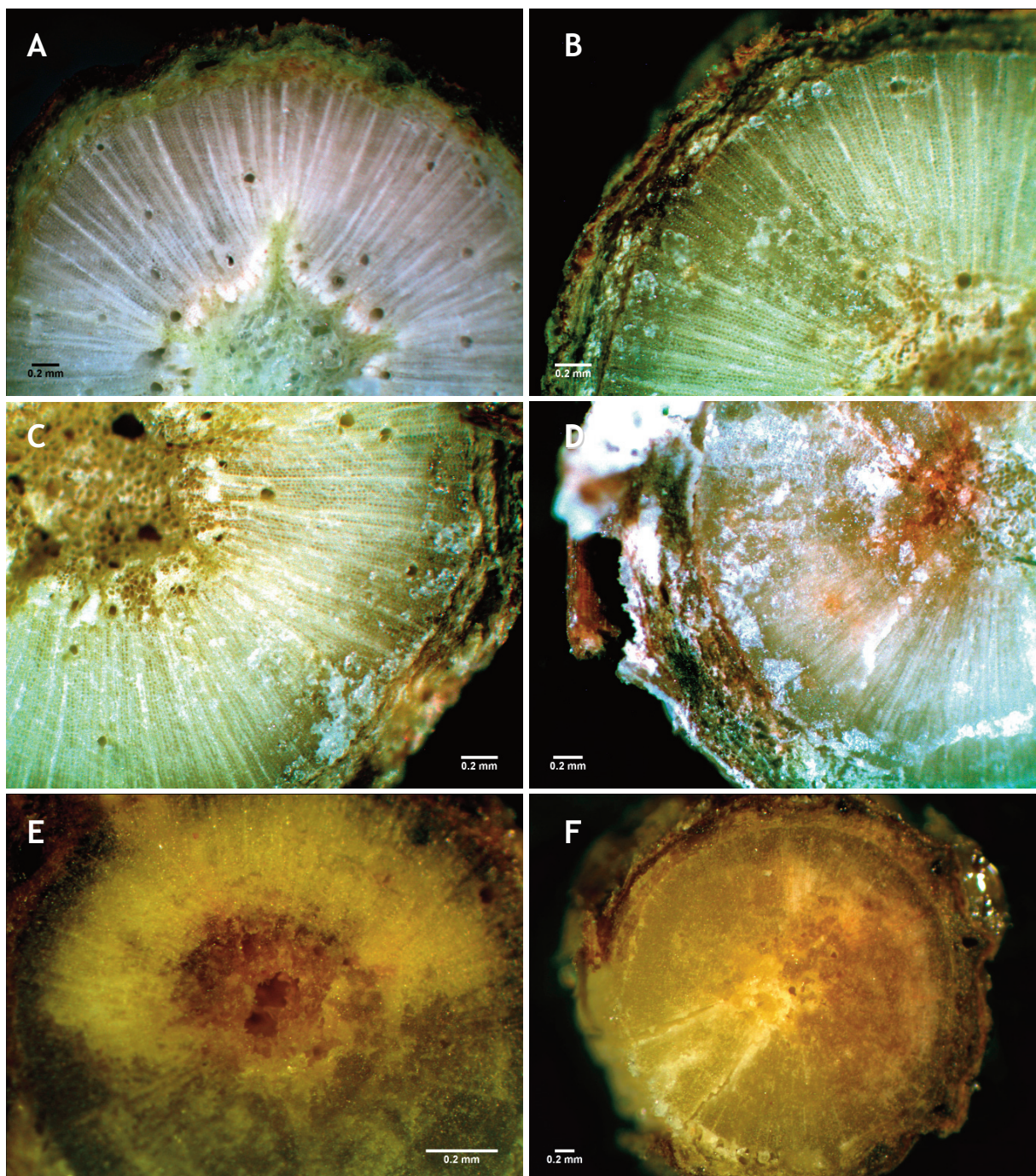


Figura 6.20. Pinos de 18 meses crecidos con TCA, transcurridos 35 días (A-D) o 56 (E-F) de la inoculación con *F. circinatum*. A) planta asintomática; B y C) plantas sintomáticas en las que se aprecia que comienza la necrosis y la producción de resina en la zona del punto de inoculación; D) planta sintomática en la que se observa una región completamente necrotizada (zona por donde ha llegado el patógeno) y la médula desestructurada y una zona sana (zona opuesta al punto de inoculación); E y F) plantas sintomáticas en las que la necrosis se extiende desde el punto de inoculación hasta la mitad de la sección del tallo.

que había conseguido penetrar en el interior de las plantas. Sin embargo, la escasa altura de los pinos crecidos solo con agua, y particularmente su diámetro y la biomasa de tallo y acículas (Tabla 6.6), no permitió obtener suficiente material vegetal para realizar la extracción de su material genético y, por lo tanto, obtener muestras

biológicas individuales. Es por ello que solo se pudo comparar entre los dos tipos de fertilizantes aplicados

La determinación de la cantidad de hongo presente en el tallo de plantas sintomáticas mostró que en los pinos crecidos en vivero con fertilizante convencional fue

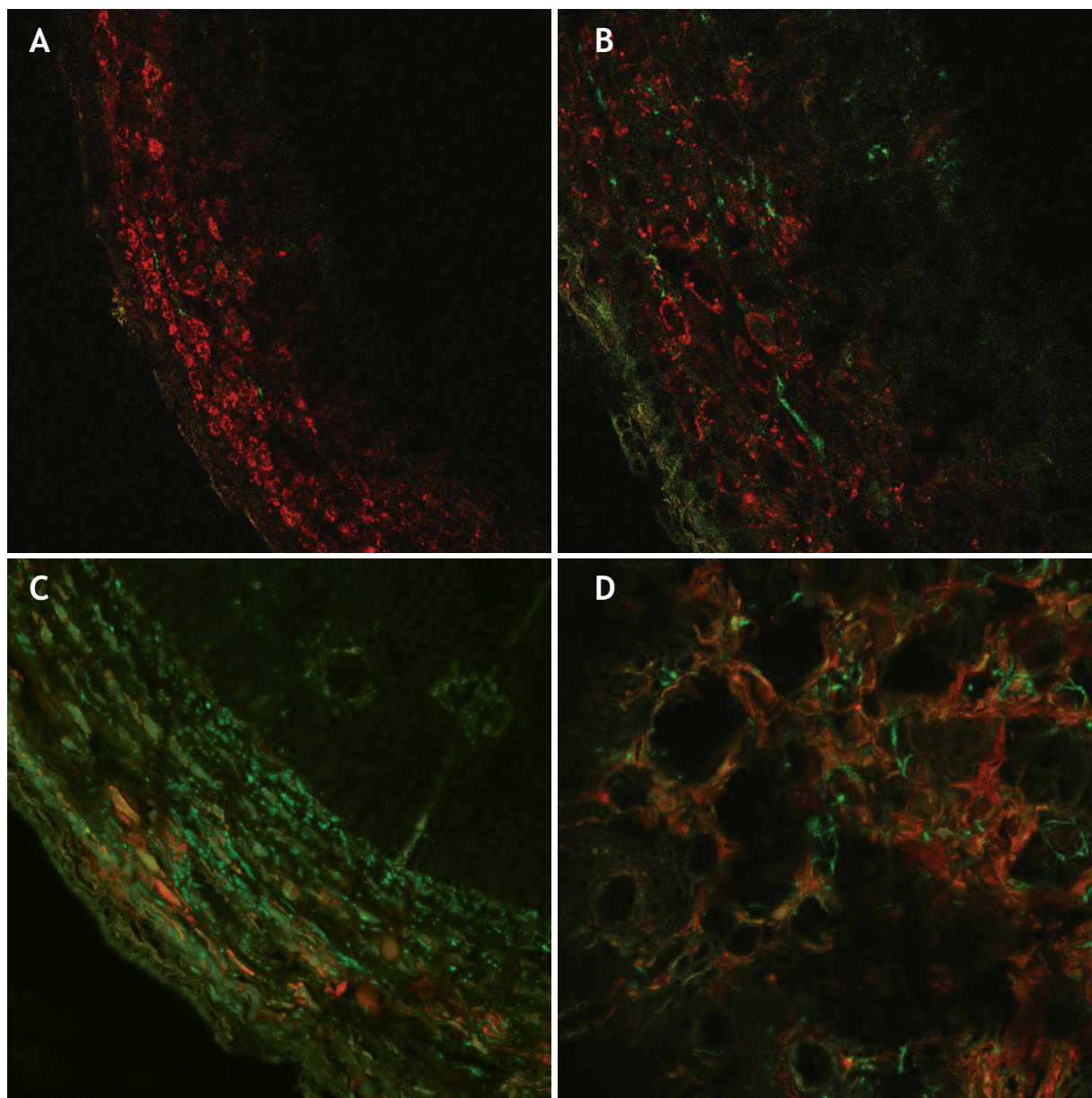


Figura 6.21. Pinos de 18 meses crecidos con TCA y observadas bajo microscopio confocal. A y B) detalle del córtex tras 35 dpi. La región intercelular se encuentra colonizada por las hifas del patógeno y ha comenzado a invadir el xilema; C) córtex y xilema tras 56 dpi. *F. circinatum* se extiende entre las células corticales y su densidad ha aumentado en el tejido xilemático y D) colonización de la médula por el patógeno a los 56 dpi y comienzo de su desestructuración.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

Tabla 6.6. Altura, diámetro, peso fresco de hojas y del tallo de aquellos pinos de 18 meses infectados con *F. circinatum*. Tamaño muestral n=12.

	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Acículas (g PF)	Tallo (g PF)
Agua	28,2 ± 1,0 c	2,8 ± 0,1 c	1,8 ± 0,2 c	1,1 ± 0,1 c
Convencional	76,9 ± 1,5 a	8,2 ± 0,5 a	44,5 ± 4,4 a	39,4 ± 5,9 a
TCA	57,7 ± 1,6 b	4,8 ± 0,1 b	11,1 ± 0,8 b	7,6 ± 0,6 b

1,22 veces superior al de los crecidos con TCA y llegó a ser 1.913 veces superior en las asintomáticas. También se observó esta tendencia en la cantidad de hongo presente en las acículas, en la que, bajo fertilización convencional, ésta fue 28 veces superior en las acículas de plantas sintomáticas y 722 veces en el caso de las asintomáticas (Figura 6.22).

Además de cuantificar la cantidad de patógeno en los tejidos, se analizó el contenido de hormonas, tanto de estrés como de crecimiento que presentaban las plantas infectadas y sin infectar, así como la expresión relativa de enzimas implicados en la defensa frente a patógenos, con el fin de buscar posibles diferencias a nivel de intensidad y/o rapidez con la que se desencadenaba la resistencia sistémica adquirida.

Con respecto al contenido en hormonas, a los 2 dpis los pinos regados con agua experimentaron un incremento, con respecto al control, de Ácido Abscísico (ABA), Ácido Salicílico (AS) y Ácido Indolacético (AIA) en un 40%, 123% y 32%, respectivamente. El Ácido Jasmónico (AJ) no se detectó en pinos de este tratamiento sin infectar, sin embargo, en los infectados alcanzó una concentración de 0,09 µg/g (Figura 6.23A). En los pinos infectados que habían sido fertilizados de forma convencional, únicamente el ABA y el AS vieron incrementada su concentración con respecto al control en un 2% y 87%, respectivamente (Figura 6.23B). Finalmente, los pinos fertilizados con TCA experimentaron un incremento en la concentración de AS con respecto a los pinos no infectados de un 296% y Brasinosteroides (BR) de un 31% (Figura 6.23C); en el caso de los BR el incremento fue especialmente notable para la Castasterona (CS) (10,40 ± 0,65 µg/g) y los Brasinólidos (BL) (1,40 ± 0,08 µg/g). En ambos tipos de fertilización, la concentración de AS se vio incrementada en detrimento del resto de las hormonas de estrés, y, sobre todo, de las Citoquininas (CK) y Giberelinas (GA).

La comparación en función de la nutrición reflejó que, aquellas plantas sin infectar fertilizadas de forma convencional contenían una mayor concentración de AIA,

Tabla 6.7. Resultados estadísticos de la ANOVA para las distintas concentraciones de hormonas, medidas en plantas de *P. radiata* de 18 meses A) sin infectar (-Fc) y B) a los 2 días de la inoculación con *F. circinatum* (+Fc) según el tipo de fertilización. Las siglas NS indican ausencia de significancia y las diferentes letras diferencias significativas, según el análisis *post hoc*.

A)	Agua	Convencional	TCA
Ác. Abscísico	NS	NS	NS
Ác. Jasmónico	NS	NS	NS
Ác. Salicílico	NS	NS	NS
Ác. Indolacético	c	a	b
Citoquininas	b	b	a
Giberelinas	NS	NS	NS
Brasinosteroides	NS	NS	NS

B)	Agua	Convencional	TCA
Ác. Abscísico	NS	NS	NS
Ác. Jasmónico	a	b	b
Ác. Salicílico	b	b	a
Ác. Indolacético	NS	NS	NS
Citoquininas	NS	NS	NS
Giberelinas	c	a	b
Brasinosteroides	c	b	a

mientras que aquellas fertilizadas con TCA, contenían una mayor concentración de CK, no existiendo diferencias significativas con respecto a las demás hormonas (Tabla 6.7A). Sin embargo, a los 2 días de ser inoculadas con las esporas patógenas, las plantas regadas con agua mostraron el mayor contenido de AJ y desaparecieron las diferencias entre tratamientos en cuanto al contenido del AIA y las CK, en beneficio de una mayor síntesis de GA por parte de los pinos fertilizados de forma convencional y de AS y BR por parte de los pinos fertilizados con TCA (Tabla 6.7B).

Por otra parte, la cuantificación de la expresión relativa de enzimas implicados en la síntesis de flavonoides, isoprenoides y proteínas de defensa mostró que el

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

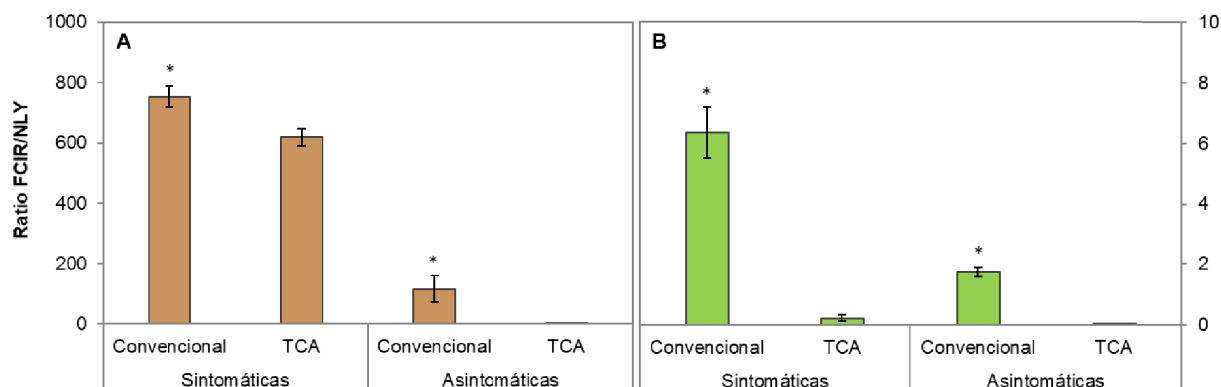


Figura 6.22. Cuantificación absoluta obtenida tras dividir los ng/μL de ADN de *F. circinata* entre los ng/μL de ADN de *P. radiata* para tallos de plantas sintomáticas y asintomáticas (A) y acículas de plantas de pino sintomáticas y asintomáticas (B) de 18 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas según el test de la T. Tamaño muestral n=3.

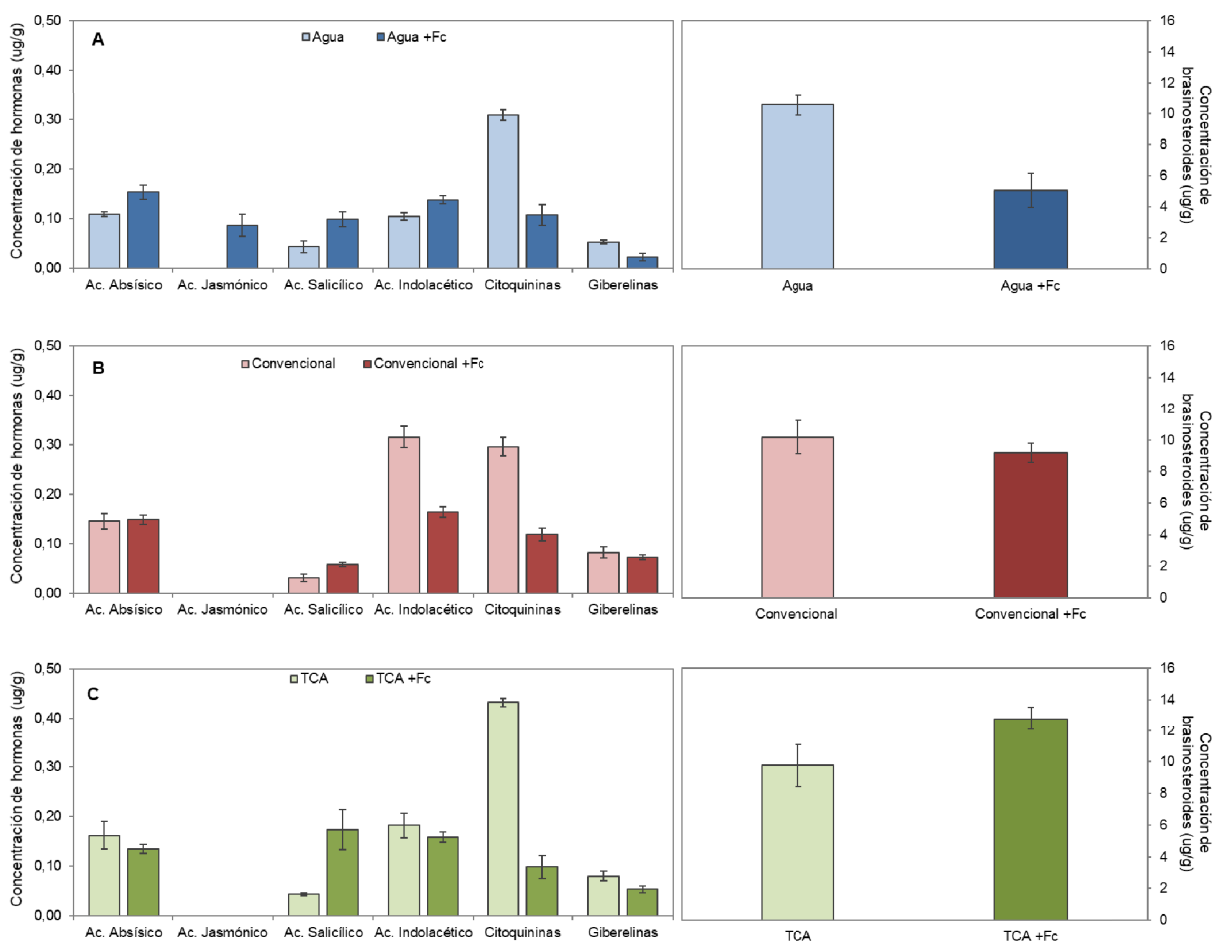


Figura 6.23. Concentración de hormonas de estrés (Ác. Abscísico, Ác. Jasmónico y Ác. Salicílico) y de crecimiento (Ác. Indolacético = Auxinas), Citoquininas, Giberelinas y Brasinosteroides en plantas de pino de 18 meses sin infectar (-Fc) y a los 2 días de la inoculación con *F. circinata* (+Fc), para tipos de fertilización A) Agua, B) Convencional y C) TCA. Tamaño muestral n=3.

6. Evaluación de la efectividad del TCA en producción de planta forestal

gen que más se expresó fue CHS (Chalcona Sintasa), seguido por PAL (Fenilalanina Amonio Liasa). Además, el nivel de expresión cambió en función del órgano estudiado, siendo significativamente mayor en acículas que en tallo. Por último, fue evidente que el tipo de nutrición jugó un papel importante a la hora de desarrollar una respuesta más intensa, ya que la mayor expresión se observó en plantas fertilizadas con TCA. No se detectó actividad Glucanasa en ninguno de los tratamientos, ni en los diferentes órganos de la planta (Figura 6.24).

6.7. CARACTERIZACIÓN DE LA PLANTA TRASPLANTADA A CAMPO DESDE VIVERO

Transcurrido un año del trasplante a campo, se observó que los pinos crecidos en vivero con fertilización convencional habían logrado un mayor crecimiento en altura (131 cm) que los crecidos con agua o con TCA (99 cm), aunque no se detectaron diferencias a nivel de diámetro del cuello de raíz, que rondó los 11 mm. Sin embargo, a pesar de su mayor porte, los pinos con fertilización convencional fueron los más susceptibles

al estrés post-trasplante, contabilizándose un 53% de marras, muchas de ellas con evidentes síntomas de enfermedad; las marras no superaron el 10% en el caso de los pinos fertilizados con TCA, y el 4% en las crecidas solo con agua. Además, algunos de los pinos supervivientes presentaban gran daño en las acículas, en concreto un 6% en el caso del riego con agua y con fertilizante convencional y un 2% en el caso del riego con TCA (Tabla 6.8).

Dado que el decaimiento del ápice y la marchitez son síntomas de un estado avanzado de infección por fitopatógenos del damping-off, se comprobó si este daño pudiera estar causado por *F. circinatum*. Sin embargo, utilizando los cebadores FCIR-F y FCIR-R apareció un fragmento con una Tm de 60,9 en prácticamente todas las acículas de pino analizadas, por lo que se constató que el hongo causante no era *F. circinatum*, cuyo amplicón con estos cebadores presentó una Tm de 87,5, sino probablemente *Lecanosticta acicola* (Thum) Syd., causante de la enfermedad conocida como “banda marron”, y que desde hace unos pocos años presenta una especial incidencia en las plantaciones jóvenes de pino radiata en toda Bizkaia.

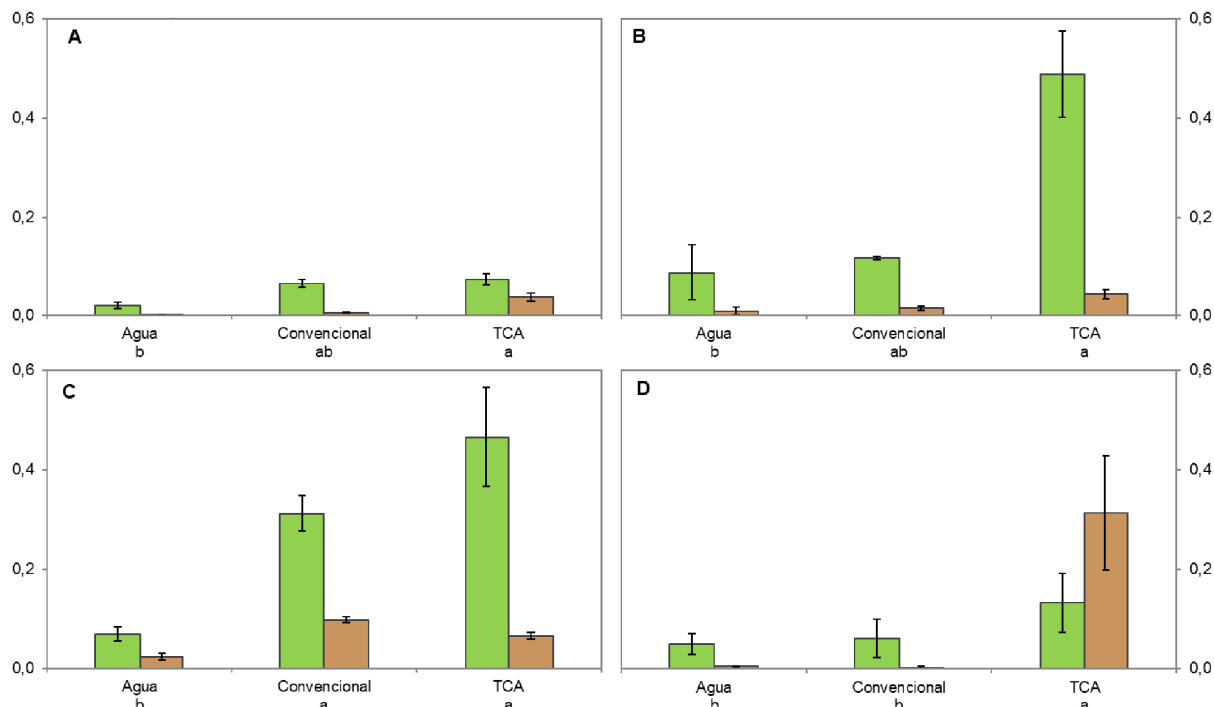


Figura 6.24. Cuantificación relativa de la inducción de los genes Quitinasa(A), Fenilalanina Amonio Liasa (B), Chalcona Sintasa (C) e Hidroximetilglutaril-CoA Reductasa 2 (D) en acícula y tallo tras la inoculación del tallo de plantas de 18 meses con esporas de *F. circinatum*. Tamaño muestral n=3.

Tabla 6.8. Altura (cm) y diámetro (mm) de los pinos trasplantados a desde vivero a campo y crecidos durante 9 meses. Además, se expresa el porcentaje de marras afectadas en el proceso de postransplante y porcentaje total de plantas dañadas de aquellos árboles a los que se practicó una incisión en el tallo. Las letras (a,b) junto a los números indican diferencias significativas según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=96.

	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Marras(%)	Plantas con síntomas
Agua	48,5 ± 1,1 c	11,0 ± 0,2	4,2 ± 1,0 c	6%
Convencional	131,4 ± 1,0 a	11,7 ± 0,2	53,1 ± 2,0 a	6%
TCA	99,1 ± 1,0 b	11,0 ± 0,3	10,4 ± 1,0 b	2%





7 Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

A fin de determinar si la comunidad microbiana experimentaba cambios en función del tipo de fertilización, se realizaron aislamientos de la microbiota de los suelos para, posteriormente, clasificar y cuantificar las distintas especies presentes en cada tratamiento. Se comenzó con la caracterización de las poblaciones microbianas que componían el té de compost, posteriormente se calculó el número de UFCs extraídas de cada suelo fertilizado, y finalmente, sobre medio sólido, se procedió a reconocer cada colonia aislada con objeto de identificar las especies y poder determinar su importancia en el conjunto de la comunidad.

7.1. CUANTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO

Para la cuantificación de UFCs por gramo de suelo y la determinación del número total de especies microbianas mediante recuento en placa, se realizaron varias pruebas previas de aislamiento en diferentes medios de cultivo (Agar Luria-Bertani o *LB*, Agar Cetrimida, Agar Melin-Norkrans Modificado, o *MMN* y Agar Patata Dextrosa, o *PDA*) a fin de detectar el medio que permitiera un mejor contaje y una adecuada identificación. Una vez crecidas todas las colonias en los diferentes medios de cultivo, se decidió seleccionar aquellos medios que ofrecieron los resultados más completos: el agar *LB* para el recuento general de bacterias; el agar Cetrimida para el recuento de bacterias del género *Pseudomonas* y el agar *MMN* para el recuento de hongos. También fue posible determinar que la abundancia de organismos eucariotas en el suelo fue un orden inferior con respecto a la bacteriana. Todas las estimaciones de abundancia promedio para cada taxón vienen detalladas en la tabla 7.1.

Los resultados estadísticos de los recuentos llevaron a concluir, de forma general, que: 1) en cuanto al tipo de sustrato, la mayor abundancia bacteriana se encontró en los bancales arenoso e IAS y en cuanto al tipo de fertilización, tanto la nutrición mineral, como la orgánica favorecían ese incremento de la población; 2) de entre la comunidad bacteriana, los microorganismos del género *Pseudomonas* predominaron en los bancales arenoso y arcilloso, viéndose además incrementada su abundancia en el caso de la fertilización con TCA y 3) de entre todos los sustratos analizados, se encontró una mayor densidad fúngica en el bancal enmendado con IAS, influyendo además positivamente la fertilización con TCA (Tabla 7.1).

De forma complementaria, en la figura 7.1 se ha representado la proporción de cada taxón con respecto al

total de la población para cada suelo y tratamiento de fertilización. Los sustratos con una proporción bacteriana inferior al 80% fueron el bancal arenoso regado con agua (68%) y con TCA (72%) y el arcilloso fertilizado de forma convencional (70%) y con TCA (47%). Es de resaltar la abundante proporción de bacterias del género *Pseudomonas* en el bancal arenoso y arcilloso fertilizados con TCA (25 y 46% respectivamente), así como de hongos en la turba fertilizada con TCA (15%) y bancal arenoso sin fertilizar (14%).

La observación detallada de las colonias procedentes de los extractos de suelo permitió identificarlas y clasificarlas en función de características morfológicas, cuyas particularidades fenotípicas se detallan en la Tabla 7.2 en el caso de las bacterias, en la Tabla 7.3 para las especies de *Pseudomonas* y en la Tabla 7.4 para los hongos.

7.1.1. Proporción de especies bacterianas (excluidas las del género *Pseudomonas*)

El recuento de colonias bacterianas permitió identificar un total de 16 especies (Tabla 7.2).

En el bancal arenoso regado con agua se cuantificaron seis especies diferentes, siendo las principales *S. marcescens* con una representatividad del 33%, *B. subtilis* con un 22% y *B. pumilus* con un 20%. En cuanto a los tratamientos de fertilización, con convencional se distinguieron seis especies, de entre las cuales destacaron *L. sakei* y *L. plantarum*, representando un 55% y un 36% respectivamente; mientras que con fertilización con TCA se observó un incremento importante de la diversidad, cuantificándose un total de doce especies, volviendo a destacar *L. plantarum* con un 42% y *L. sakei* con un 36% (Figura 7.2A).

En el bancal arcilloso se diferenciaron un total de ocho especies bajo riego con agua, diez bajo riego convencional y ocho con TCA (Figura 7.2B). Presentó también dominancia de las especies *L. sakei* (25%, 54% y 47% bajo riego con agua, fertilizante convencional y TCA respectivamente) y *L. plantarum* (22%, 19% y 28% respectivamente), encontrándose además *B. subtilis* en riego con agua (18%) y *G. terrae* en suelos con fertilización convencional (13%) y con TCA (10%).

En el bancal IAS se observó una riqueza específica similar al arcilloso, con dominancia de nuevo de las especies *L. sakei* y *L. plantarum* junto con la presencia de *G. terrae* en el sustrato fertilizado de forma convencional y con TCA, con una proporción de 26% y 7%

7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

Tabla 7.1. Recuento de UFCs por gramo de suelo de bacterias, bacterias del género *Pseudomonas* y hongos, discriminado por tipo de suelo y fertilización. Las letras junto a los nombres (a,b,c) indican diferencias significativas según el test *post hoc*. Tamaño muestral n=10.

Bacterias		Arenoso	Arcilloso	IAS	Turba
		a	b	a	b
Agua	b	2,17·10 ⁵ ± 3,84·10 ⁴	5,42·10 ⁵ ± 2,00·10 ⁵	9,23·10 ⁵ ± 2,96·10 ⁵	4,15·10 ⁵ ± 5,25·10 ⁴
Conv.	a	1,64·10 ⁶ ± 1,59·10 ⁵	4,13·10 ⁵ ± 4,13·10 ⁴	1,71·10 ⁶ ± 1,44·10 ⁵	5,05·10 ⁵ ± 5,10·10 ⁴
TCA	a	1,19·10 ⁶ ± 8,08·10 ⁴	3,73·10 ⁵ ± 4,44·10 ⁴	1,48·10 ⁶ ± 1,50·10 ⁵	4,00·10 ⁵ ± 8,00·10 ⁴

<i>Pseudomonas</i> spp.		Arenoso	Arcilloso	IAS	Turba
		a	a	b	c
Agua	b	5,67·10 ⁴ ± 7,30·10 ³	5,15·10 ⁴ ± 2,86·10 ³	9,56·10 ⁴ ± 1,80·10 ⁴	9,17·10 ³ ± 1,01·10 ³
Conv.	b	1,59·10 ⁵ ± 2,91·10 ⁴	1,13·10 ⁵ ± 9,70·10 ³	6,62·10 ⁴ ± 1,22·10 ⁴	2,23·10 ⁴ ± 4,02·10 ³
TCA	a	4,14·10 ⁵ ± 7,57·10 ⁴	3,69·10 ⁵ ± 6,05·10 ⁴	1,74·10 ⁵ ± 3,25·10 ⁴	2,20·10 ⁴ ± 3,27·10 ³

Hongos		Arenoso	Arcilloso	IAS	Turba
		b	ab	a	ab
Agua	b	2,17·10 ⁵ ± 3,84·10 ⁴	5,42·10 ⁵ ± 2,00·10 ⁵	9,23·10 ⁵ ± 2,96·10 ⁵	4,15·10 ⁵ ± 5,25·10 ⁴
Conv.	a	1,64·10 ⁶ ± 1,59·10 ⁵	4,13·10 ⁵ ± 4,13·10 ⁴	1,71·10 ⁶ ± 1,44·10 ⁵	5,05·10 ⁵ ± 5,10·10 ⁴
TCA	a	1,19·10 ⁶ ± 8,08·10 ⁴	3,73·10 ⁵ ± 4,44·10 ⁴	1,48·10 ⁶ ± 1,50·10 ⁵	4,00·10 ⁵ ± 8,00·10 ⁴

Tabla 7.2. Características fenotípicas de las especies bacterianas diferenciadas (Figuras 7.12-7.23).

Especie	Forma	Borde	Superficie	Consistencia	Color	Óptica
<i>Bacillus altitudinis</i>	Irregular	Entero	Planoconvexa	Membranosa	Crema	Opaca
<i>Bacillus cibi</i>	Circular	Ondulado	Plana	Cremosa	Amarillo	Opaca, Brillante
<i>Bacillus licheniformis</i>	Irregular	Lobulado	Planoconvexa	Cremosa	Blanquecino	Opaca
<i>Bacillus marisflavi</i>	Circular	Entero	Convexa	Cremosa	Amarillo tenue	Opaca, Brillante
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Irregular	Ondulado	Plana	Cremosa	Blanquecino	Opaca, Brillante
<i>Bacillus mojavenis</i>	Circular	Ondulado	Mamelonada	Membranosa	Blanquecino	Opaca
<i>Bacillus mycoides</i>	Rizoide	Filamentoso	Planoconvexa	Membranosa	Blanquecino	Opaca
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Irregular	Ondulado	Umbilicada	Membranosa	Blanquecino	Opaca
<i>Bacillus pumilus</i>	Irregular	Lobulado	Plana	Cremosa	Blanquecino	Opaca
<i>Bacillus subtilis</i>	Circular	Entero	Plana	Cremosa	Amarillento	Opaca
<i>Gordonia terrae</i>	Circular	Entero	Convexa	Cremosa	Naranja	Opaca, Brillante
<i>Lactobacillus sakei</i>	Circular	Entero	Convexa	Cremosa	Blanco	Opaca, Brillante
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Puntiforme	Entero	Convexa	Cremosa	Blanco	Opaca, Brillante
<i>Serratia marcescens</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Cremosa	Crema	Opaca, Brillante
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Circular	Entero	Plana	Cremosa	Amarillo	Translúcida
<i>Streptomyces mauvecolor</i>	Puntiforme	Entero	Acuminada	Membranosa	Marrón	Opaca

7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

Tabla 7.3. Características fenotípicas de las especies bacterianas del género *Pseudomonas* diferenciadas (Figuras 7.24-7.29).

Especie	Forma	Borde	Superficie	Consistencia	Color	Óptica	Observaciones
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Puntiforme	Entero	Acuminada	Creмоса	Crema	Opaca, Brillante	Tinción marrón
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Creмоса	Rosa	Opaca, brillante	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Circular	Entero	Plana	Creмоса	Naranja	Opaca, brillante	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Irregular	Ondulado	Planoconvexa	Creмоса	Crema	Semitranslúcida	Fluorescencia bajo UV
<i>Pseudomonas guariconensis</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Creмоса	Rosáceo	Opaca	
<i>Pseudomonas putida</i>	Irregular	Ondulado	Plana	Creмоса	Amarillo-verdoso	Opaca, brillante	Fluorescencia bajo UV

respectivamente. En este tipo de sustrato se distinguieron un total de ocho especies bajo riego con agua, nueve con fertilización convencional y diez bajo fertilización con TCA (Figura 7.2C).

Por último, la turba presentó ciertas diferencias con los anteriores sustratos. En total se diferenciaron once especies bajo riego con agua, nueve con fertilización convencional y siete con TCA (Figura 7.2D). Bajo riego con agua y con fertilizante convencional mantenían la do-

minancia las especies *L. sakei* y *L. plantarum*; sin embargo, bajo riego con TCA, la especie predominante fue *B. marisflavi* (42%).

7.1.2. Proporción de las especies bacterianas del género *Pseudomonas*

El recuento de especies del género *Pseudomonas* mostró una baja diversidad, identificándose un total de 6 (Tabla 7.3).

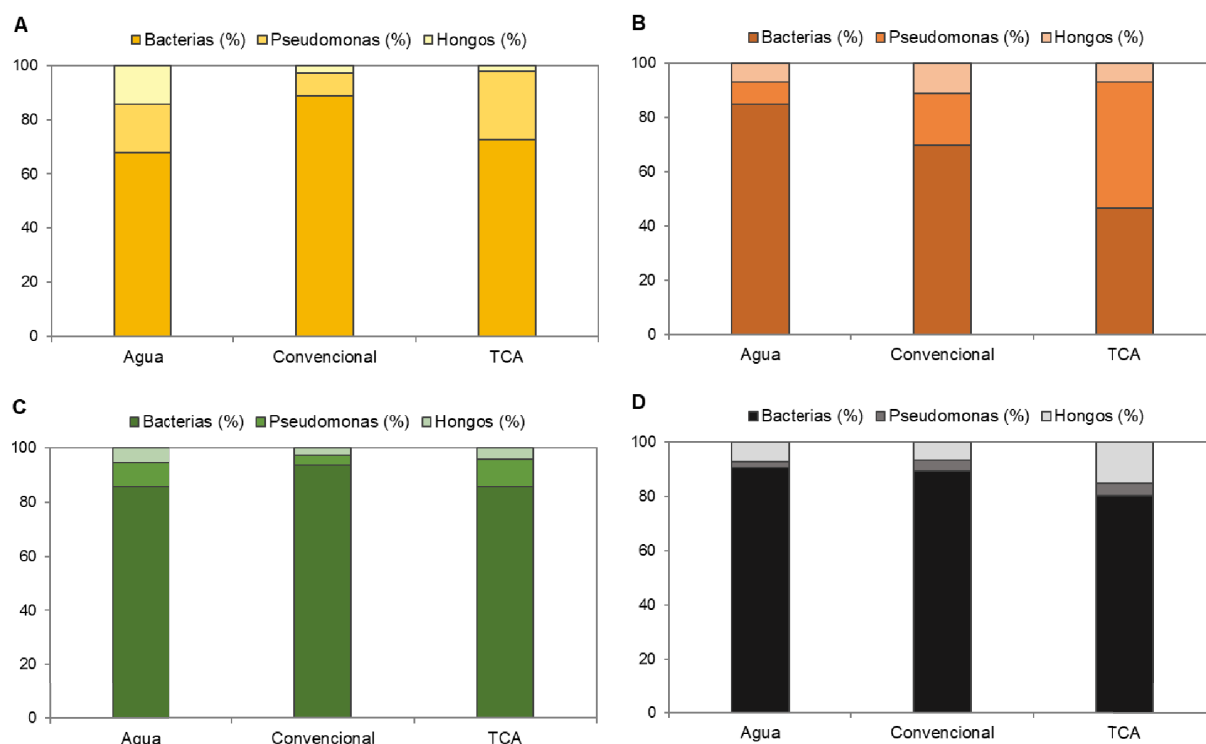


Figura 7.1. Proporción de UFCs por gramo de suelo, expresada en tanto por ciento, de los sustratos A) bancal arenoso, B) bancal arcilloso, C) bancal enmendado con IAS y D) turba de *Sphagnum*, regados con agua, fertilizante convencional y TCA clasificadas en Bacterias no *Pseudomonas*, Bacterias del género *Pseudomonas* y Hongos. Tamaño muestral n=5.

Tabla 7.4. Características fenotípicas de las especies fúngicas diferenciadas (Figuras 7.30-7.54).

Especie	Forma	Borde	Superficie	Textura	Color anverso	Color reverso	Microscopía
<i>Aaosphaeria arxii</i>	Circular	Entero	Convexa	Vellosa	Gris	Gris	Fase vegetativa con cordones miceliares
<i>Arthrimum arundinis</i>	Irregular	Lobulado	Planoconvexa	Aterciopelada	Gris	Marrón	Fase vegetativa, hifas articuladas
<i>Aspergillus cervinus</i>	Circular	Filamentoso	Planoconvexa	Pulverulenta	Amarillento	Marrón	Conidióforo ápice vesicular, fiálides uniseriadas
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Pulverulenta	Verde azulado	Verde	Conidióforo con vesícula subclaviforme
<i>Aspergillus niger</i>	Circular	Ondulado	Convexa	Granular	Negro	Blanco	Conidios aculeados, castaño oscuro
<i>Aspergillus terreus</i>	Irregular	Lobulado	Plana	Pulverulenta	Ocre	Ocre	Conidióforo con vesícula subglobosa, fiálides biseriadas
<i>Bysochlamys spectabilis</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Pulverulenta	Ocre	Naranja	Conidióforos y conidios castaño claro
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Pulverulenta	Verde grisáceo	Verde	Conidióforo poco diferenciado
<i>Clonostachys rosea</i>	Irregular	Lobulado	Planoconvexa	Algodonosa	Blanco	Blanco	Conidióforo penicilado con fiálides monospóricas
<i>Fusarium culmorum</i>	Circular	Filamentoso	Planoconvexa	Algodonosa	Rosa	Rojo	Fase vegetativa
<i>Fusarium equiseti</i>	Circular	Ondulado	Convexa	Algodonosa	Blanco y Ocre	Ocre	Fase vegetativa, hifas moniliformes
<i>Fusarium oxysporum</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Algodonosa	Violáceo	Rosa	Fase vegetativa
<i>Gliomastix murorum</i>	Irregular	Ondulado	Convexa	Vellosa	Castaño	Blanco	Conidióforo alargado con conidios agrupados en cabeza apical
<i>Ilyonectria europaea</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Algodonosa	Ocre	Ocre	Fase vegetativa
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	Rizoide	Lobulado	Planoconvexa	Aterciopelada	Blanco	Ocre	-
<i>Mucor moelleri</i>	Circular	Filamentoso	Plana	Algodonosa	Marrón	Blanco	Zigóporas aculeadas
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Pulverulenta	Verde	Amarillento	Conidióforo penicilado
<i>Penicillium concentricum</i>	Circular	Entero	Convexa	Aterciopelada	Gris	Rosa	Conidióforo penicilado
<i>Penicillium daleae</i>	Circular	Entero	Umbilicada	Aterciopelada	Rosáceo	Rosáceo	-
<i>Penicillium murcianum</i>	Circular	Ondulado	Convexa	Aterciopelada	Gris azulado	Marrón	Conidióforo penicilado, conidios globosos, equinulados
<i>Penicillium sanguifluum</i>	Circular	Entero	Planoconvexa	Algodonosa	Amarillo	Amarillo	Conidióforo penicilado
<i>Rhizopus oryzae</i>	Circular	Filamentoso	Plana	Algodonosa	Blanco	Blanco	Esporangióforos no ramificados con gran esporangio apical
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Circular	Entero	Convexa	Creposa	Rosa	Rosa	-
<i>Talaromyces wortmannii</i>	Irregular	Ondulado	Planoconvexa	Coriácea	Amarillo	Negro	Conidióforo verticilado
<i>Trichoderma ghanense</i>	Irregular	Filamentoso	Plana	Granular	Verde	Amarillenta	Conidios elipsoidales, amarillo-castaño
<i>Trichoderma harzianum</i>	Irregular	Entero	Plana	Granular	Blanco y verde	Amarillento	Fiálides cortas y anchas, monospóricas
<i>Trichoderma virens</i>	Irregular	Entero	Plana	Granular	Blanco y verde	Amarillo	Conidióforo penicilado, fiálides ampuliformes, conidios amarillo-verde
<i>Umbelopsis isabellina</i>	Circular	Entero	Plana	Pulverulenta	Blanco	Amarillento	Esporangióforo hialino con esporangio apical simple

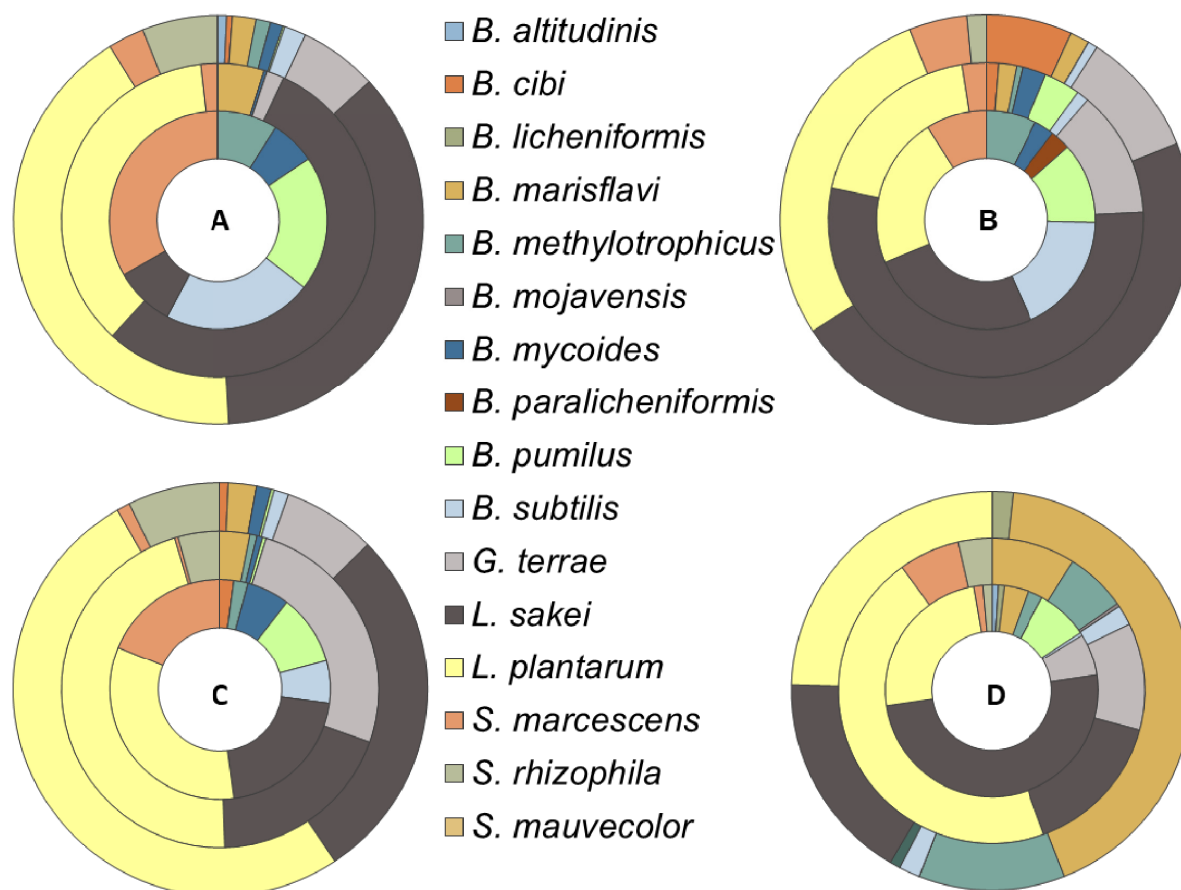
7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

En el bancal arenoso regado con agua se encontraron un total de tres especies, destacando *P. putida* con una presencia del 80% y *P. guariconensis* con un 17%. En el sustrato al que se le suministró fertilizante convencional se diferenciaron dos especies: *P. putida* (88%) y *P. alcaligenes* (12%). Bajo riego con TCA se detectaron cinco especies, de entre las cuales destacaban *P. putida* (81%) y *P. guariconensis* (10%) (Figura 7.3A).

En el caso del bancal arcilloso regado con agua aparecieron tres especies diferentes: *P. putida*, con una presencia del 68%; *P. guariconensis*, con un 28% y *P. chlororaphis*, con un 5%. Bajo riego con fertilizante convencional se distinguieron cuatro especies: *P. putida* (72%), *P. chlororaphis* (24%), y *P. alcaligenes* y *P. guariconensis* (2%); sin embargo, bajo riego con TCA, únicamente *P. putida* con una gran dominancia (95%) y *P. chlororaphis* con un 5% (Figura 7.3B).

En el bancal IAS, bajo riego con agua, se detectaron cinco especies diferentes: *P. putida* (81%), *P. chlororaphis* (10%), *P. guariconensis* (6%), *P. fluorescens* (2%) y *P. aeruginosa* (2%); con fertilización convencional se encontraron dos especies: *P. putida* (97%) y *P. chlororaphis* (3%); en el caso del riego con TCA cuatro especies: *P. putida* (62%), *P. chlororaphis* (29%), *P. guariconensis* (7%) y *P. alcaligenes* (1%) (Figura 7.3C).

Por último, en turba se distinguieron tres especies bajo riego con agua: *P. putida* (84%), *P. fluorescens* (14%) y *P. guariconensis* (2%); las mismas especies se encuentran bajo riego con fertilizante convencional aunque en proporciones diferentes: *P. putida* (95%), *P. guariconensis* (4%) y *P. fluorescens* (1%); sin embargo, bajo riego con TCA desaparece la dominancia de *P. putida* (38%) en favor de *P. aeruginosa* (44%), apareciendo también



P. chlororaphis (15%), *P. fluorescens* (3%) y *P. guariconensis* (2%) (Figura 7.3D).

Debido a la aparición en este apartado de dos especies del género *Pseudomonas* interesantes desde el punto de vista de la promoción del crecimiento vegetal y no presentes originalmente en el TCA, se decidió realizar un estudio de solubilización, como se realizó anteriormente en el capítulo 3. De esta forma se pudo observar que mostraban, especialmente *P. chlororaphis*, una capacidad fijadora de nitrógeno superior a la que mostró *O. tritici* ($3,24 \pm 0,13$), una capacidad solubilizadora de fósforo ($2,10 \pm 0,07$) y potasio ($6,03 \pm 0,10$), similar a la que mostraron *P. aeruginosa* y *P. putida*, respectivamente; mientras que *P. guariconensis* mostró un índice de fijación de nitrógeno de $2,51 \pm 0,13$ e índices de solubilización de P y K de $1,93 \pm 0,08$ y $5,69 \pm 0,33$, respectivamente.

7.1.3. Proporción de las especies fúngicas

El recuento de especies fúngicas, en cambio, mostró una alta diversidad, identificándose un total de 28 especies (Tabla 7.4).

Así, en suelo arenoso regado con agua, se cuantificaron un total de quince especies, de entre las que destacaban *F. oxysporum* y *A. fumigatus*, con una presencia del 14%, así como *F. equiseti* y *C. rosea* con un 11%. La adición de fertilizante provocó una disminución en la diversidad, pero este descenso varió en función del tipo de fertilización. Así, con fertilizante convencional se encontraron ocho especies, destacando *C. cladosporioides* (40%) y *R. oryzae* (20%), pero con fertilización con TCA, se encontraron once especies, predominando *C. cladosporioides* e *I. europaea* con un 18% y *A. cervinus* con un 15% (Figura 7.4). Es de resaltar la dominancia

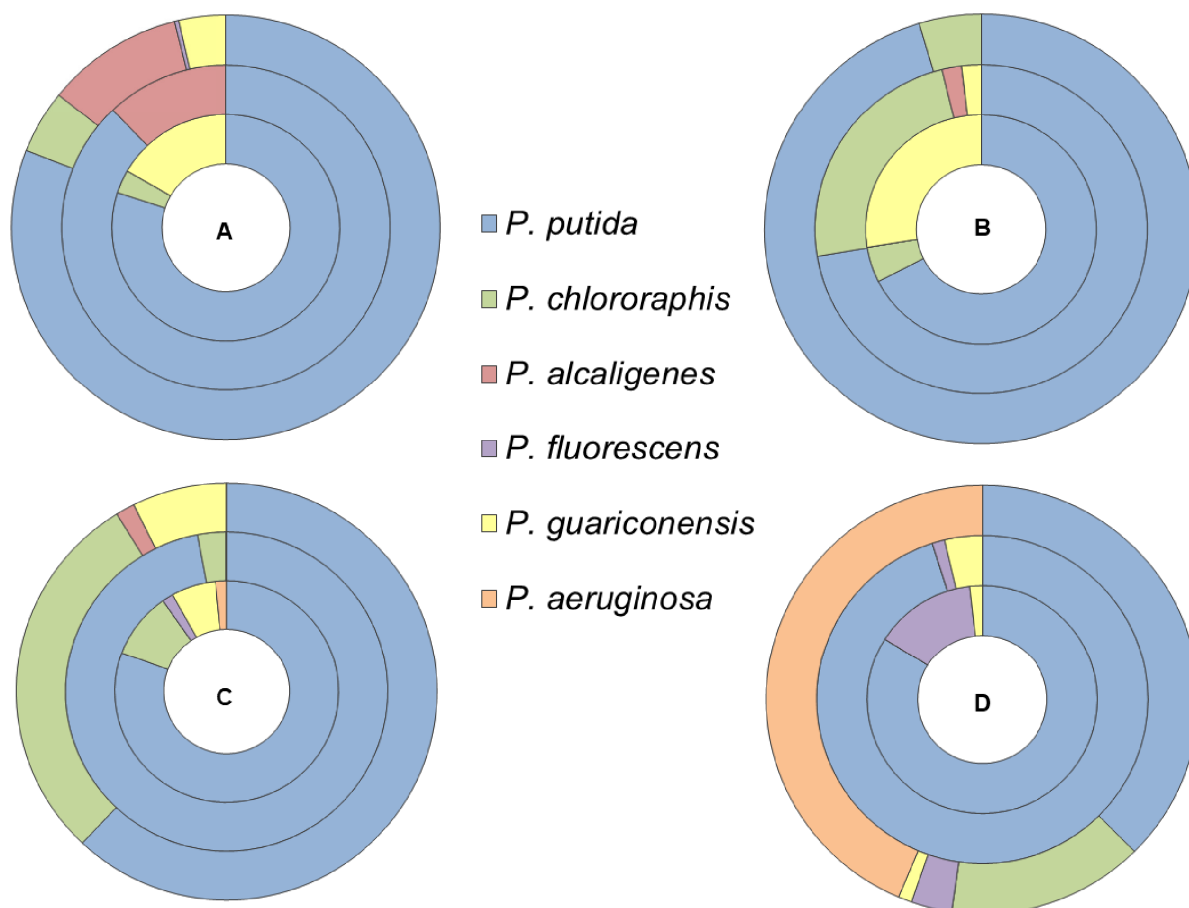


Figura 7.3. Proporción de las diferentes especies del género *Pseudomonas*, en tanto por ciento, aislados de los sustratos A) bancal arenoso, B) bancal arcilloso, C) bancal enmendado con IAS y D) turba de *Sphagnum*, regados con agua (circunferencia interior), fertilizante convencional (circunferencia intermedia) y TCA (circunferencia exterior). Tamaño muestral n=5.

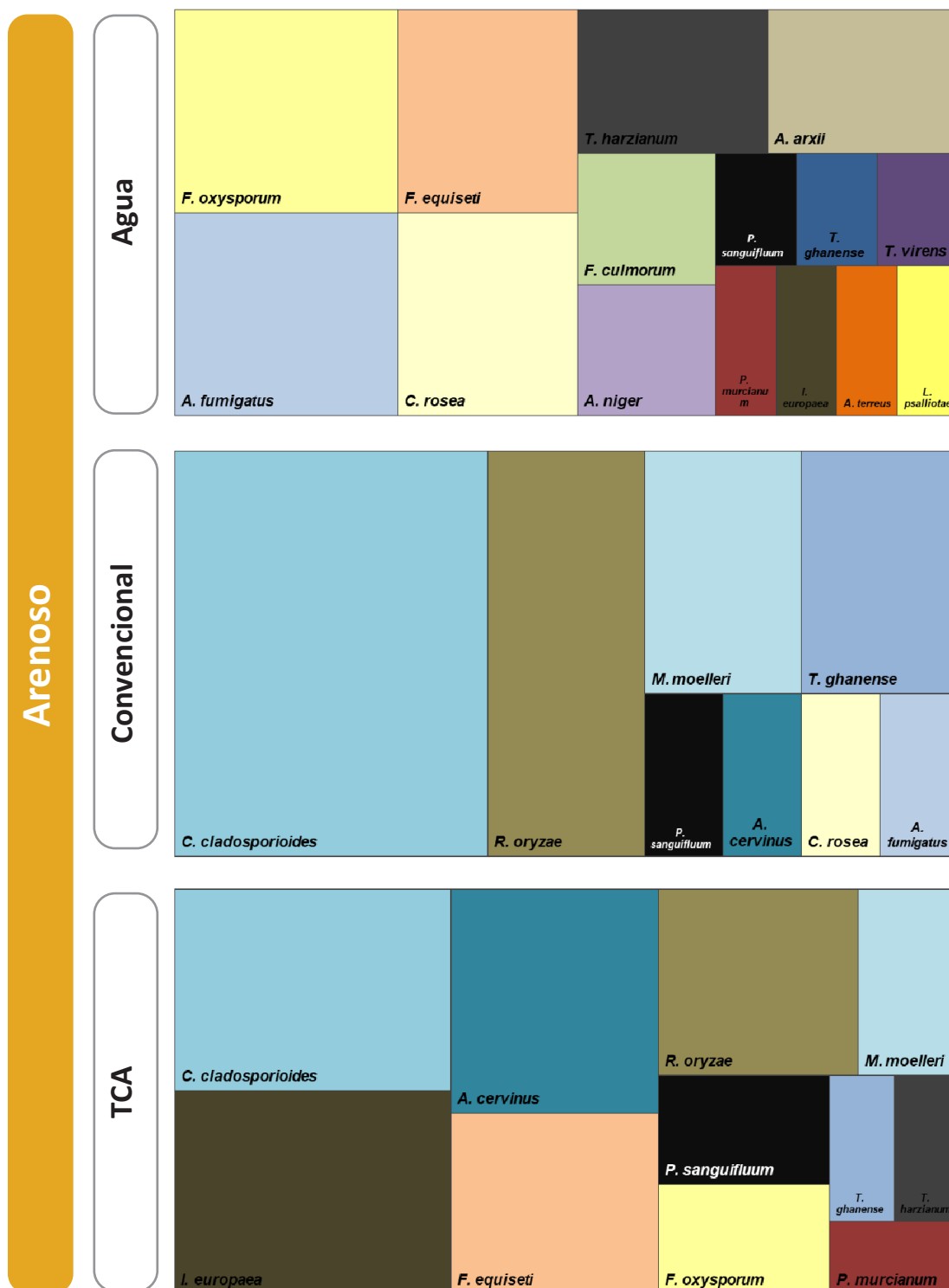


Figura 7.4. Proporción de las diferentes especies fúngicas, en tanto por ciento, aislados del bancal arenoso bajo riego con agua, fertilizante convencional y TCA. Tamaño muestral n=5.

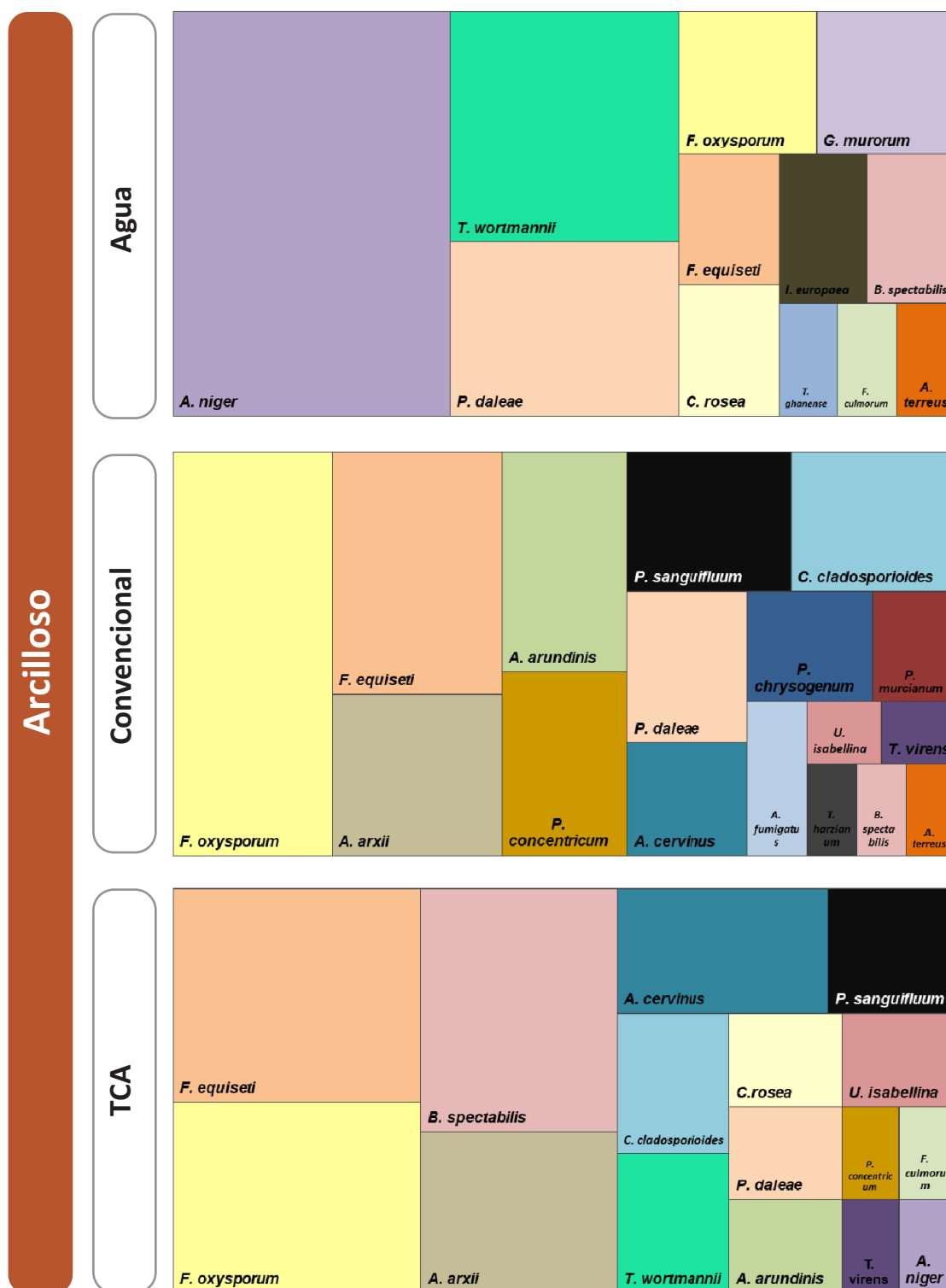


Figura 7.5. Proporción de las diferentes especies fúngicas, en tanto por ciento, aislados del bancal arcilloso bajo riego con agua, fertilizante convencional y TCA. Tamaño muestral n=5.



Figura 7.6. Proporción de las diferentes especies fúngicas, en tanto por ciento, aislados del bancal IAS bajo riego con agua, fertilizante convencional y TCA. Tamaño muestral n=5.

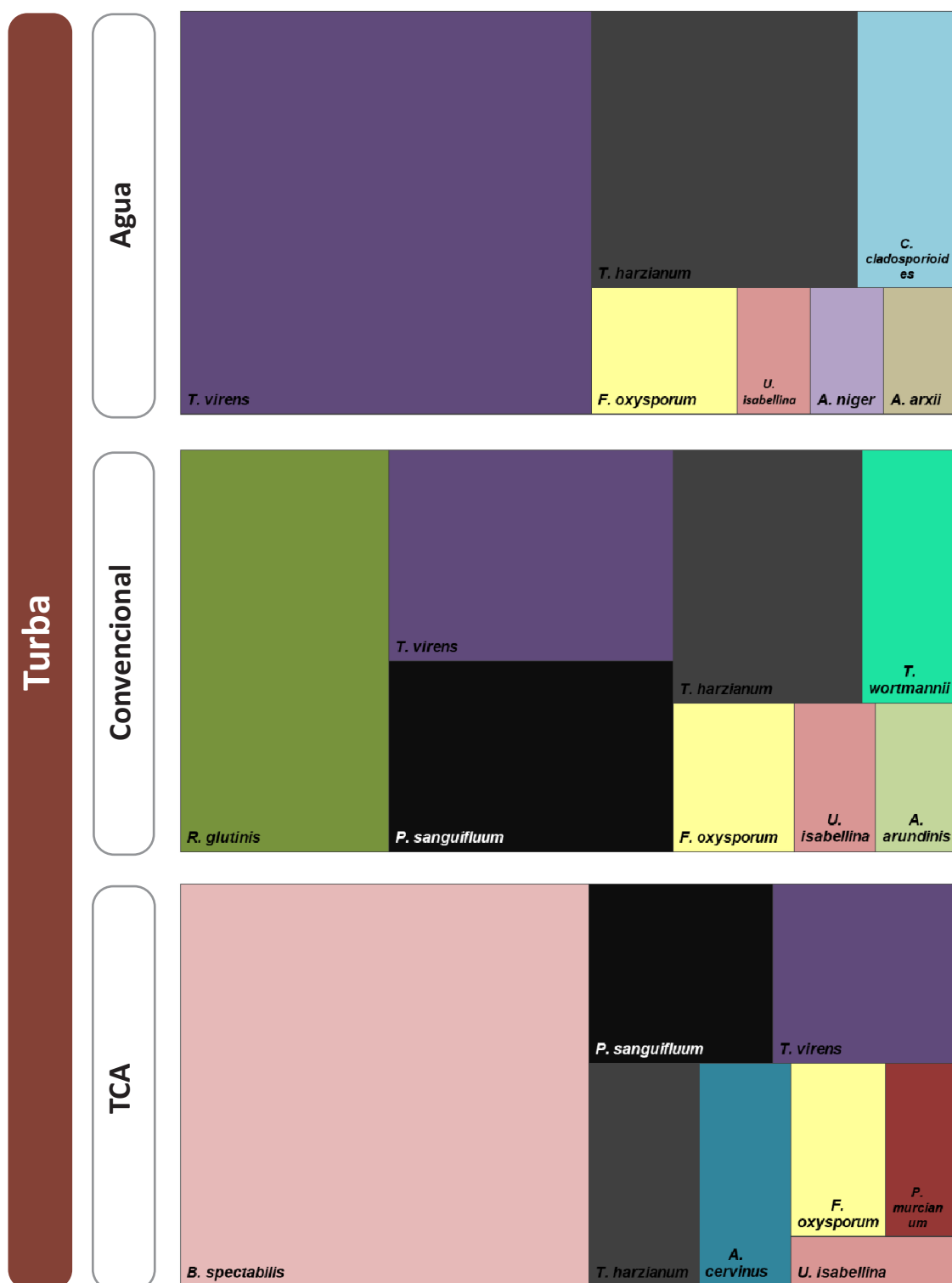


Figura 7.7. Proporción de las diferentes especies fúngicas, en tanto por ciento, aislados de la turba de *Sphagnum* bajo riego con agua, fertilizante convencional y TCA. Tamaño muestral n=5.

7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

de la especie *C. cladosporioides* en presencia de fertilizante convencional, desplazando al resto de especies fúngicas.

En el caso del suelo arcilloso se detectó el mayor número de especies fúngicas (un total de 17), encontrándose doce en el bancal arcilloso regado con agua, con una clara dominancia de la especie *A. niger* (35%), seguida por *T. wortmannii* (17%) y *P. daleae* (13%). Contrariamente a lo que se observó en el bancal arenoso, en el arcilloso la diversidad fúngica se vio favorecida con la fertilización, distinguiéndose hasta diecisiete especies bajo fertilización convencional, con dominancia de las especies *F. oxysporum* (20%) y *F. equiseti* (13%), y dieciséis especies bajo fertilización con TCA, donde predominaban *F. equiseti* (17%), *F. oxysporum* y *B. spectabilis* (15%) (Figura 7.5). En este sustrato en particular fue la ausencia de nutrición externa la que condujo a la dominancia de una única especie, *A. niger*, de forma opuesta a como sucedía en el bancal arenoso fertilizado de forma convencional.

En el bancal con IAS se detectaron catorce especies bajo el riego con agua, donde abundaban las especies *F. oxysporum* y *A. arxii* (17%) y *M. moelleri* (11%). Sin embargo, con la fertilización cambió el patrón de distribución que se venía repitiendo en los anteriores sustratos, predominando bajo fertilización convencional las especies *A. cervinus* (26%), *P. murcianum*, *A. arundinis* y *G. muro-rum* (11%). Bajo fertilización con TCA se detectaron dieciséis especies con porcentajes muy similares, destacando ligeramente *P. sanguifluum* (16%) y *A. arxii* (10%), seguidos por *M. moelleri*, *F. oxysporum*, *P. daleae* y *B. spectabilis* con un 8% de presencia con respecto al total en todos los recuentos (Figura 7.6).

Al igual que lo observado con las bacterias, es la turba la que mostró una menor diversidad en cuanto a colonias fúngicas. En turba regada con agua, crecieron un total de siete especies diferentes, destacando *T. virens* (53%) y *T. harzianum* (24%). Bajo fertilización convencional se pudo cuantificar hasta un total de ocho especies, destacando la levadura *R. glutinis* (27%), junto con *T. virens* (19%) y *P. sanguifluum* (17%). Por último, bajo riego con TCA se encontraron un total de ocho especies, destacando *B. spectabilis*, con un 53% de representación. La Figura 7.7 permite visualizar cómo la turba es un sustrato con baja riqueza específica y con

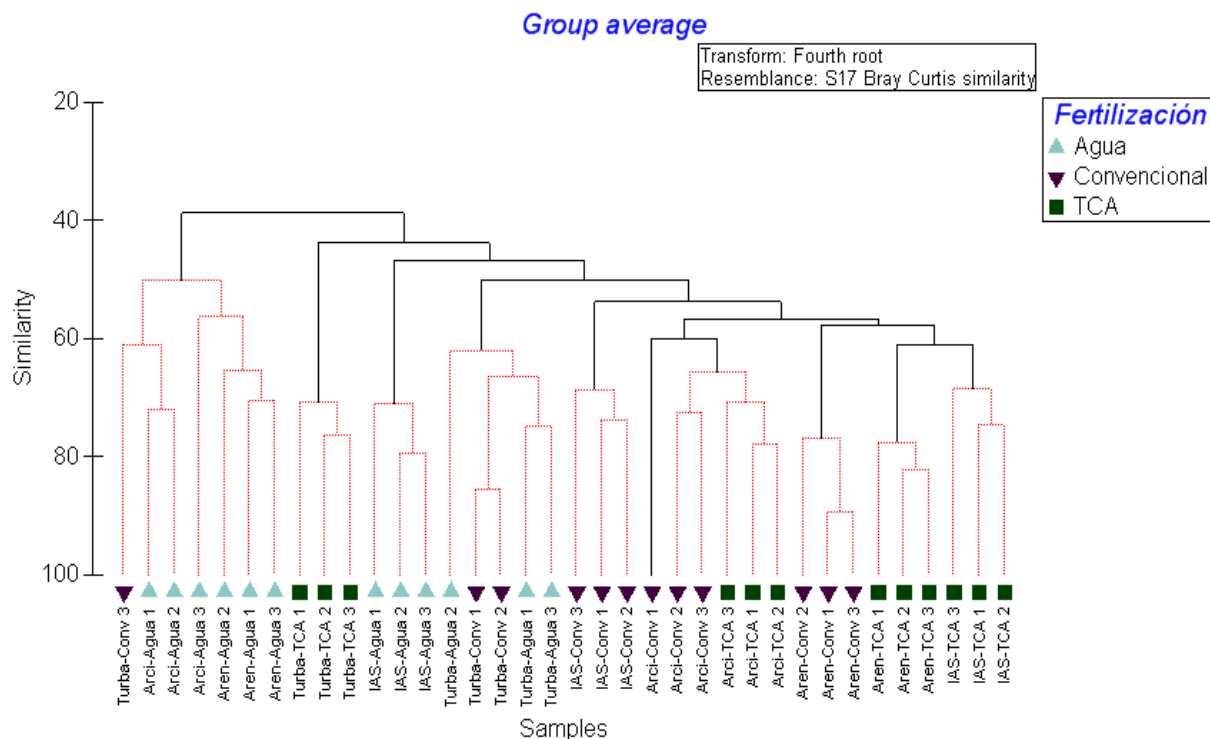


Figura 7.8. Análisis de clasificación (Cluster) de los diferentes suelos ensayados (sustrato y fertilización) en base a la composición y abundancia de su comunidad microbiana. Tamaño muestral n=3.

una clara dominancia de una o dos especies, por lo tanto, se podría decir que presenta una baja diversidad fúngica.

7.2. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO

El análisis de clasificación (Cluster) de los diferentes suelos utilizados en los ensayos (sustrato y fertilización) realizado en base a la composición y abundancia de las diferentes poblaciones microbianas, nos permitió distinguir algunos agrupamientos interesantes en base a la similitud de éstas mediante el índice de similitud de Bray-Curtis. Estableciendo una similitud estadísticamente significativa del 50% se pudieron observar 4 grupos diferenciados: el primero, compuesto por las tres réplicas de los sustratos arcilloso y arenoso regadas con agua, junto con una de las réplicas de la turba fertilizada con fertilizante convencional; el segundo, donde figuran únicamente las tres réplicas de la turba fertilizada con TCA; el tercero, compuesto por las tres réplicas del sustrato IAS regado con agua y el cuarto, donde confluyen el resto de tratamientos, es decir, la turba regada con agua y con fertilizante convencional y los

sustratos arenoso, arcilloso e IAS fertilizados de forma convencional y con TCA (Figura 7.8).

La representación del análisis de coordenadas principales (PCO) realizado muestra una separación progresiva de los suelos regados con agua frente a los suelos con fertilización convencional y TCA a lo largo del eje de coordenadas 1 (eje X) y que explica un 30,8% de la variabilidad total (Figura 7.9). El eje de coordenadas 2 (eje Y) mostró una clara polarización de los sustratos arenoso-arcilloso-IAS con respecto a la turba, y con una explicación del 16,9% de la variabilidad, por lo que este eje estaría relacionado con el tipo de sustrato. En conjunto, el efecto sinérgico tanto de sustrato como de fertilización explicaría un 47,7% de la variabilidad total (Figura 7.9).

En las figuras 7.10 y 7.11, se representa la distribución de algunas especies generalistas y otras específicas, que explican la distribución de los sustratos ensayados en base a su comunidad microbiana. Así, *S. marcescens* se encontró fundamentalmente en sustrato arenoso, arcilloso e IAS fertilizado con TCA y agua; mientras que en turba es menos frecuente. Sólo puntualmente se ha ob-

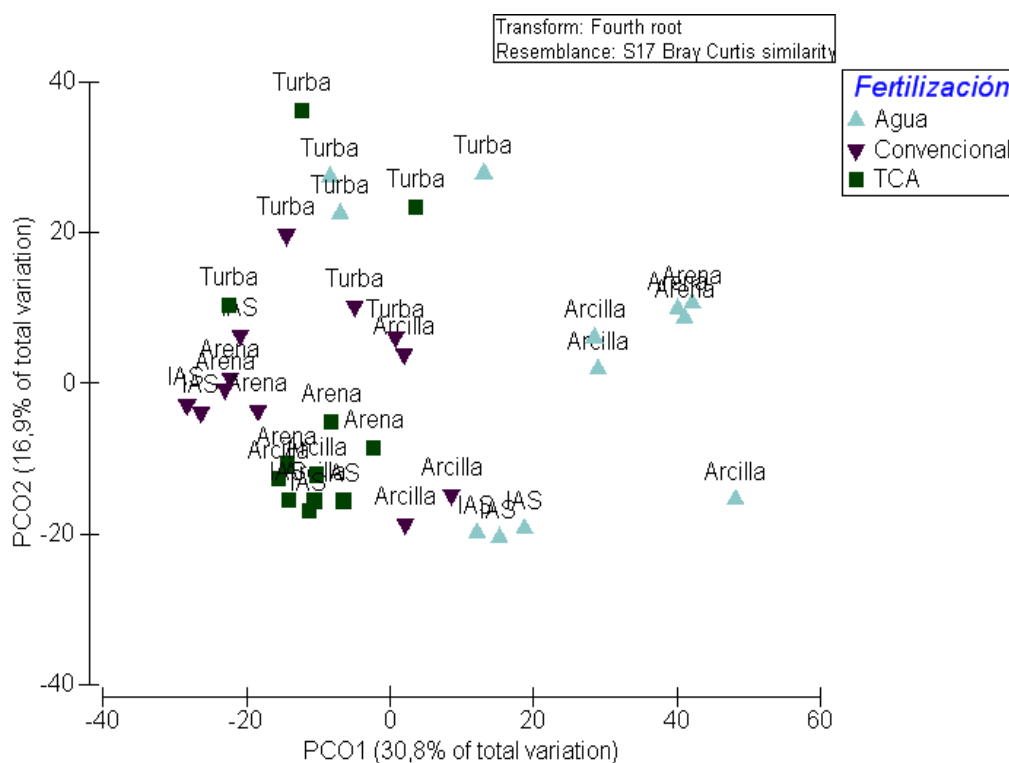


Figura 7.9. Análisis de coordenadas principales (PCO) de los sustratos basado en la matriz de similitud de Bray-Curtis y con transformación de raíz cuarta de los datos de abundancia de todas las especies microbianas. Tamaño muestral n=3.

7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

servado en turba con convencional (Figura 7.10A). *B. cibi* fue localizado esencialmente en los sustratos arenoso, arcilloso y en IAS fertilizado con TCA, y puntualmente p.e. en arcilla fertilizada de forma convencional (Figura 7.10B). *P. putida* es un buen ejemplo de especie generalista, ya que se ha encontrado en todos los sustratos y fertilizaciones estudiadas, aunque ha sido más abundante en sustratos arenoso, arcilloso e IAS fertilizadas con TCA (Figura 7.10C). *P. chlororaphis* al igual que *P. putida* mostró una preferencia por los sustratos arenoso-arcilloso-IAS fertilizados con TCA, aunque también se ha encontrado en IAS regado con agua y en turba fertilizada con TCA (Figura 7.10D). Con respecto a los hongos, destacar que *P. sanguifluum* ha resultado abundante en turba fertilizada de forma convencional y con TCA, así como en otros sustratos fertilizados, pero generalmente ausente en suelos regados con agua (Figura 7.11A). *F. oxysporum* es claramente generalista, salvo

por su ausencia en los sustratos turba y bancal arcilloso regados con agua (Figura 7.11B). *F. equiseti* parece mostrar preferencia por los sustratos con menor contenido orgánico (Figura 7.11C). Sin embargo, *T. virens* muestra una distribución más asociada a presencia orgánica, como en turba regada con TCA y sustrato arenoso e IAS fertilizado de forma convencional y con TCA (Figura 7.11D). Asimismo, *T. harzianum* resultó abundante en sustratos fertilizados con TCA, y puntualmente en sustrato arenoso, turba e IAS fertilizados de forma convencional (Figura 7.11E). Finalmente, destacar la especie fúngica *B. spectabilis* cuya su presencia ha sido observada principalmente en sustratos fertilizados con TCA, y, de forma esporádica, en sustrato arcilloso y arenoso fertilizado de forma convencional (Figura 7.11F).

Con el objetivo de valorar si los sustratos analizados presentaban una diversidad específica equilibrada o,

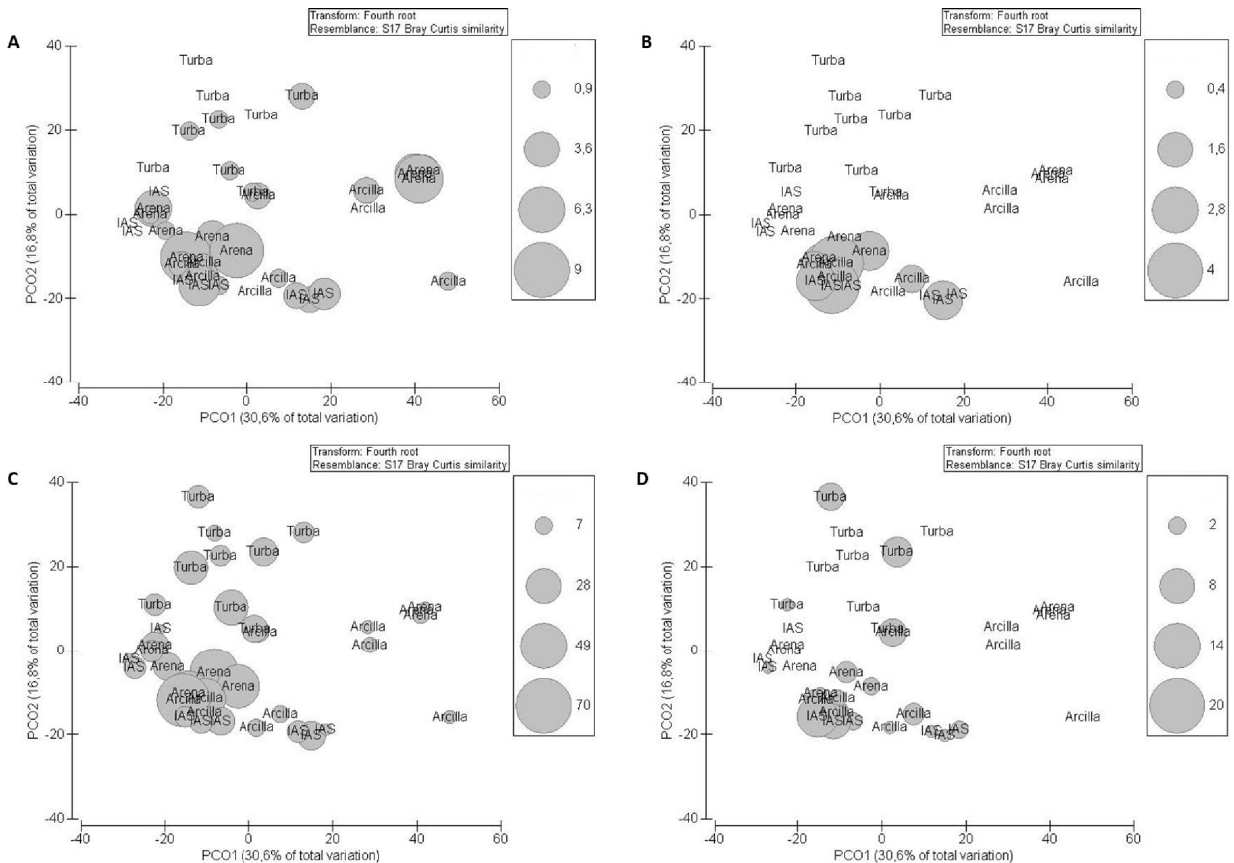


Figura 7.10. Análisis de coordenadas principales (PCO) de los sustratos basado en la matriz de similaridad de Bray-Curtis y con transformación de raíz cuarta de los datos de abundancia de las especies *S. marcescens* (A), *B. cibi* (B), *P. putida* (C) y *P. chlororaphis*. Tamaño muestral n=3.

7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

por el contrario, con marcada dominancia de alguna especie se ha calculado el índice de Shannon-Weaver y Simpson (Tabla 7.5). El índice de Shannon-Weaver mide el grado de incertidumbre de a qué especie pertenece un individuo escogido aleatoriamente en la población y

comprende normalmente valores entre 0 y 5, considerando valores de 3 como una comunidad bien diversificada; por el contrario, el índice de Simpson aporta el concepto de dominancia midiendo la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar en la comunidad

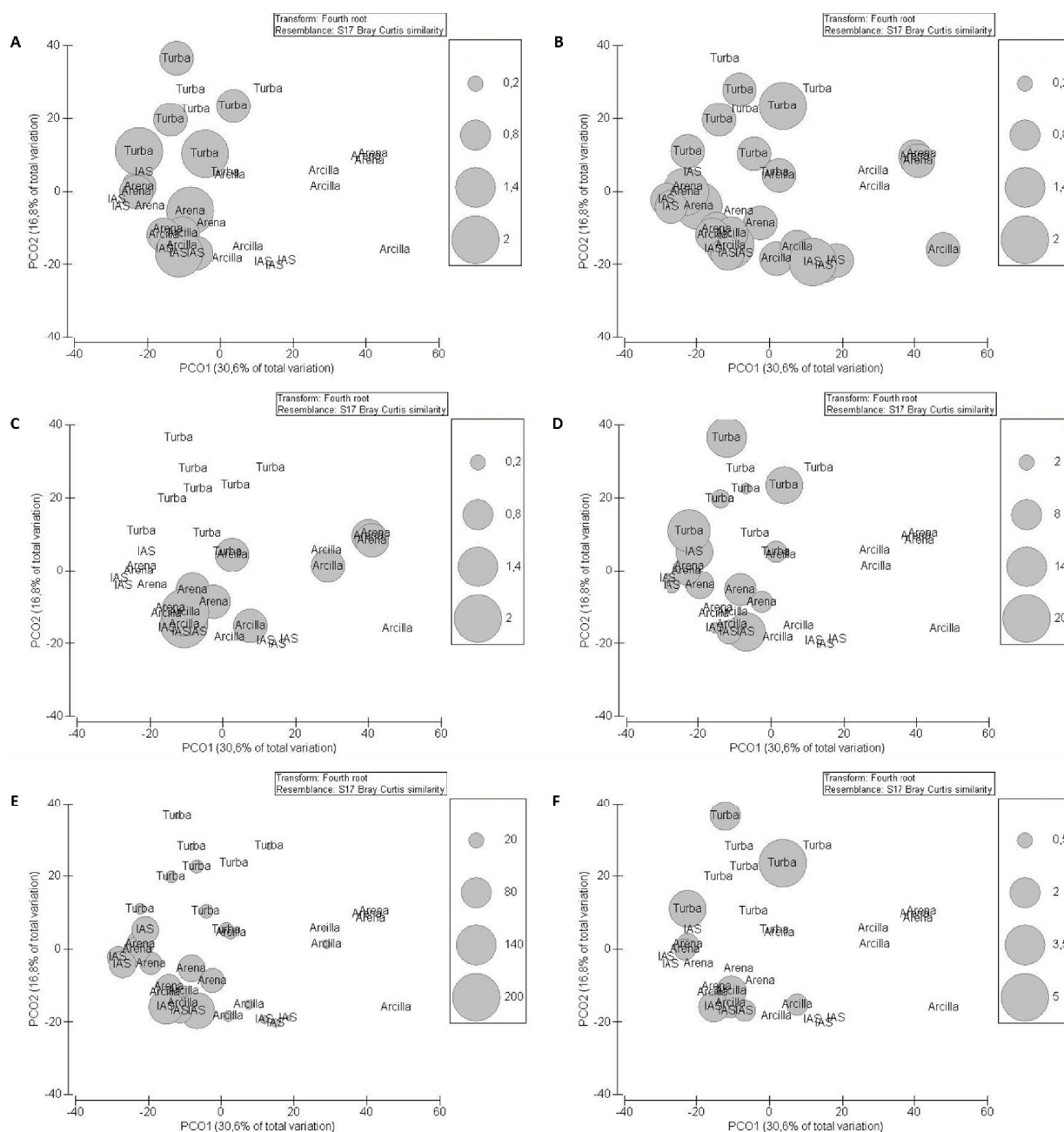


Figura 7.11. Análisis de coordenadas principales (PCO) de los sustratos basado en la matriz de similaridad de Bray-Curtis y con transformación de raíz cuarta de los datos de abundancia de las especies fúngicas *P. sanguifluum* (A), *F. oxysporum* (B), *F. equiseti* (C), *T. vires* (D), *T. harzianum* (E) y *B. spectabilis* (F). Tamaño muestral n=3.

7. Caracterización de la microbiota del suelo en función del manejo

pertenezcan a la misma especie y comprende valores entre 1 (dominancia de una especie) y 0 (ausencia de dominancia). El resultado del análisis reflejó que los sustratos con mayor diversidad específica fueron el sustrato arcilloso fertilizado de forma convencional, que presentó un índice H' de 3,380, y el sustrato IAS fertilizado con TCA, con un índice H' de 3,30. Por el contrario, el sustrato que menor diversidad específica presentó fue el sustrato arenoso fertilizado de forma convencional, que presentó un índice H' de 2,64. Destacar, además, que los sustratos de turba también mostraron bajo índice de diversidad y que los valores del índice de Simpson fueron muy cercanos a 1, especialmente en los sustratos arenoso-agua, arcilloso-convencional e IAS-agua, lo que estaría indicando que, aún dentro de que las comunidades estudiadas fueron más o menos diversas, en todas existió dominancia de alguna especie en concreto, lo que concuerda con lo ya mencionado en el apartado de cuantificación y recogido en las figuras de la 7.2 a la 7.7.

Tabla 7.5. Índices de diversidad univariados de los sustratos analizados en la comunidad microbiana. H' = índice de Shannon-Weaver y λ = índice de Simpson. Tamaño muestral $n=3$.

		H'	λ
Arenoso	Agua	3,14	0,98
Arenoso	Convencional	2,64	0,95
Arenoso	TCA	3,23	0,97
Arcilloso	Agua	3,10	0,98
Arcilloso	Convencional	3,38	0,98
Arcilloso	TCA	3,18	0,98
IAS	Agua	3,26	0,98
IAS	Convencional	2,98	0,96
IAS	TCA	3,30	0,98
Turba	Agua	2,98	0,97
Turba	Convencional	2,93	0,97
Turba	TCA	2,94	0,97

7.3. GUÍA FENOTÍPICA DE LAS ESPECIES
MÁS REPRESENTATIVAS

7.3.1. BACTERIAS

Figura 7.12. *Bacillus altitudinis* Shivaji et al., 2006



Figura 7.13. *Bacillus cibi* Yoon et al., 2005

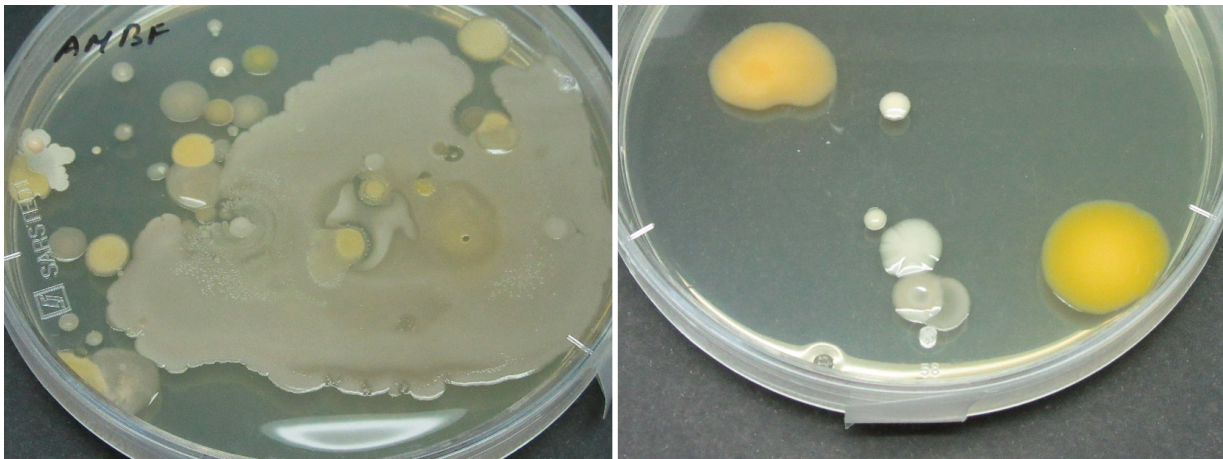


Figura 7.14. *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester, 1901

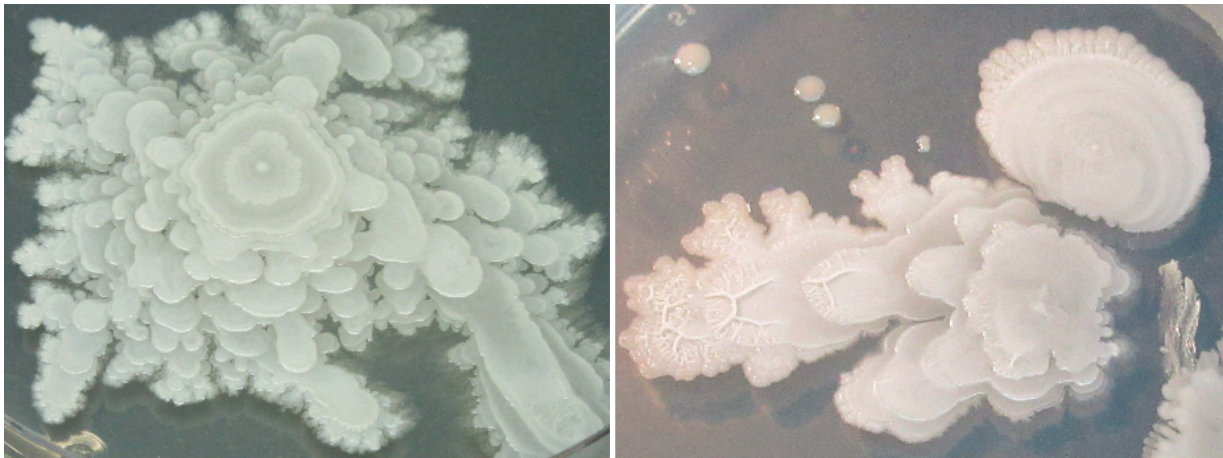


Figura 7.15. *Bacillus methylotrophicus* Madhaiyan et al., 2010

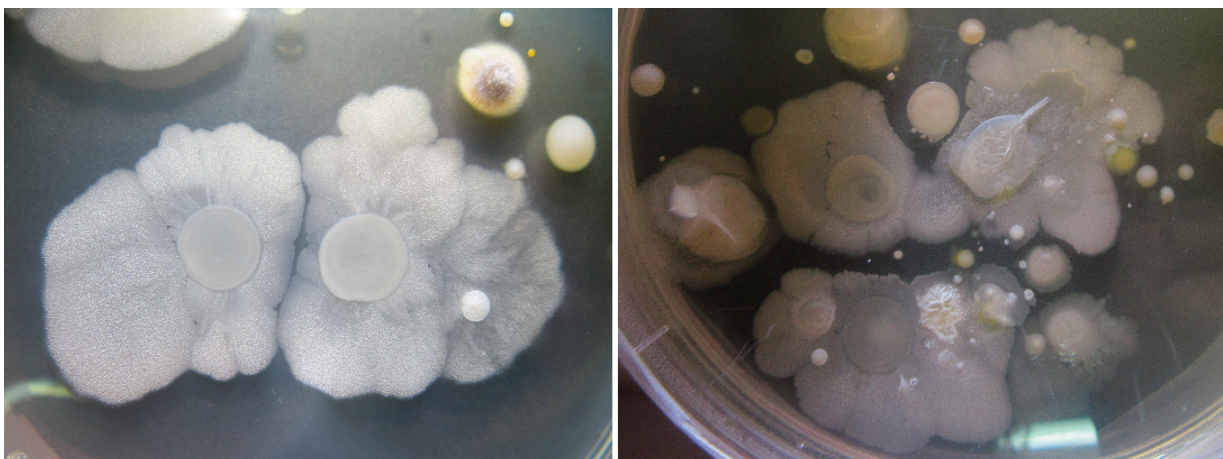


Figura 7.16. *Bacillus mojavensis* Roberts et al., 1994

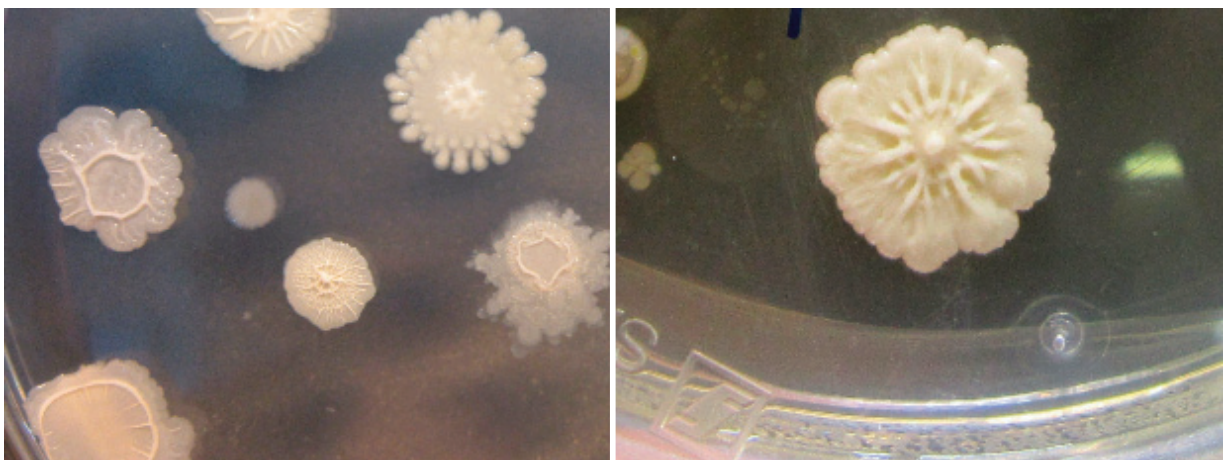


Figura 7.17. *Bacillus mycoides* Flügge, 1886

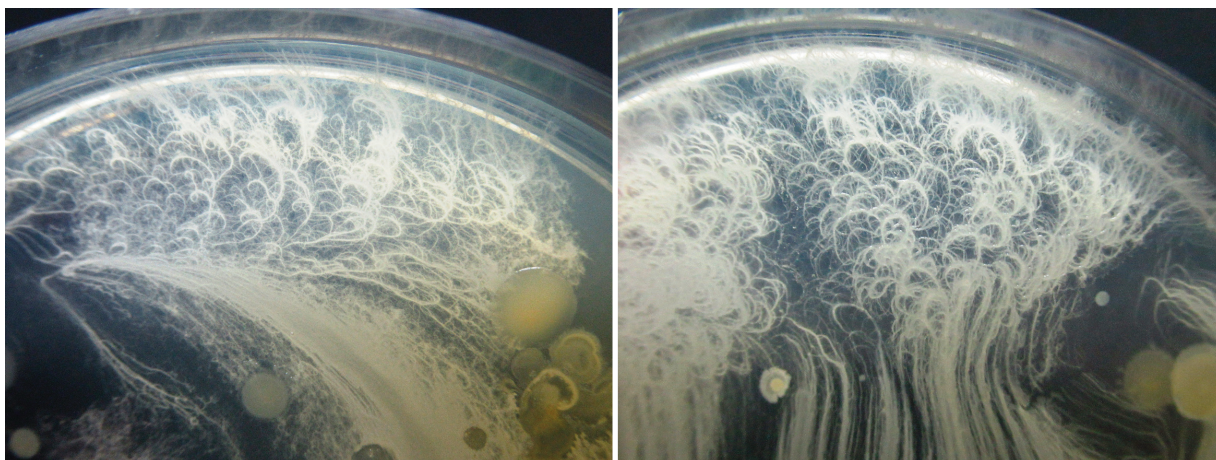


Figura 7.18. *Bacillus paralicheniformis* Dunlap et al., 2015



Figura 7.19. *Bacillus pumilus* Meyer & Gottheil, 1901

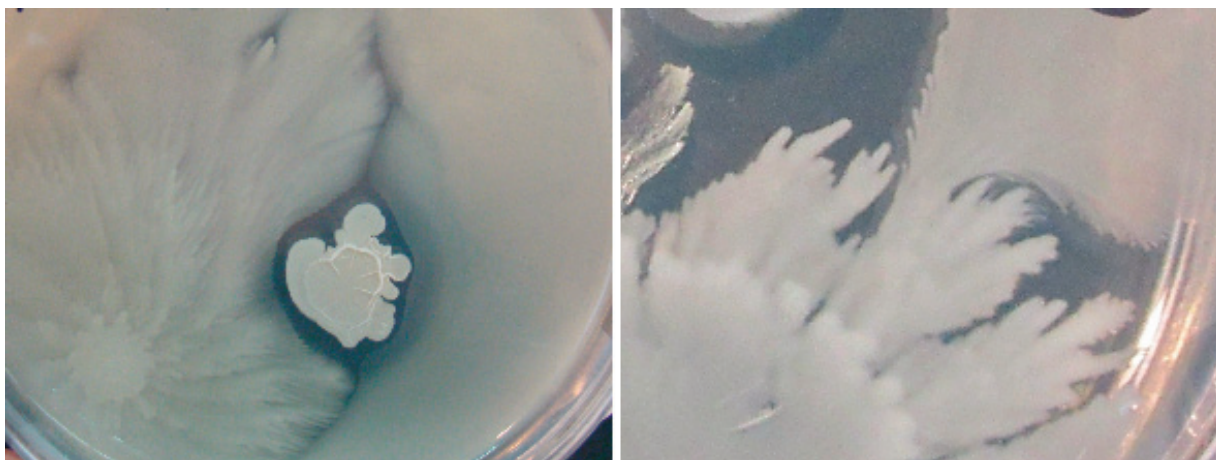


Figura 7.20. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, 1872



Figura 7.21. *Gordonia terrae* (Tsukamura) Stackebrandt et al., 1989

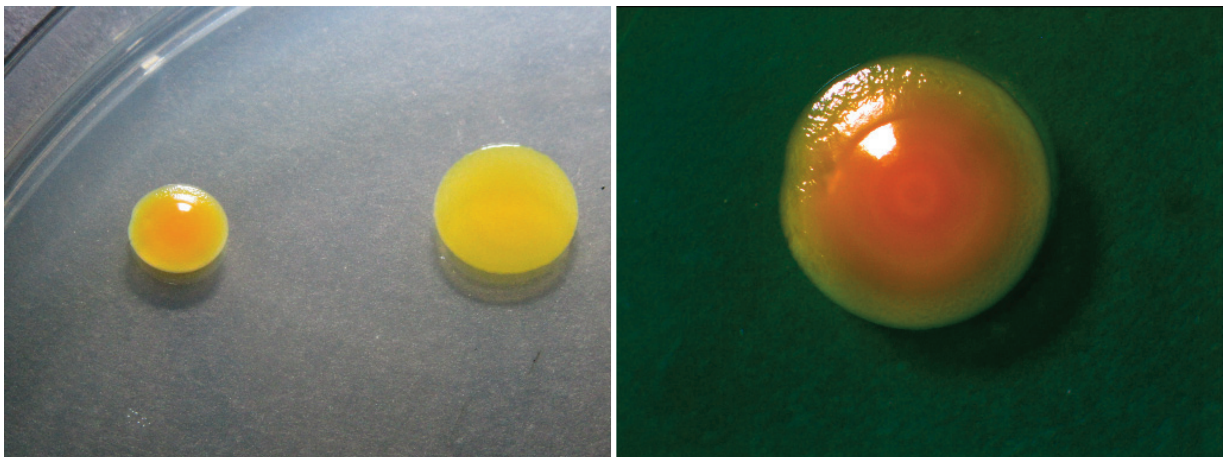


Figura 7.22. *Lactobacillus sakei* Katagiri et al., 1934

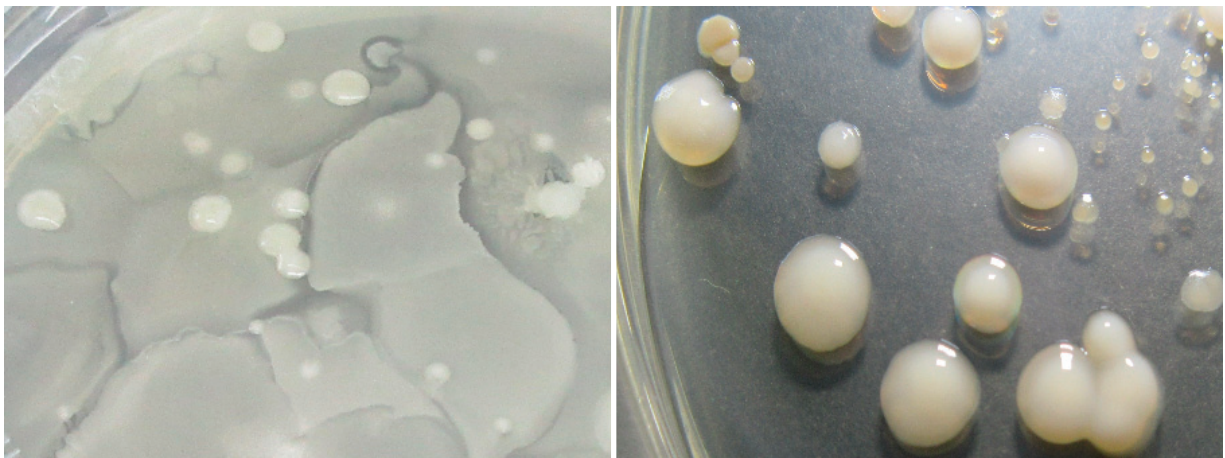
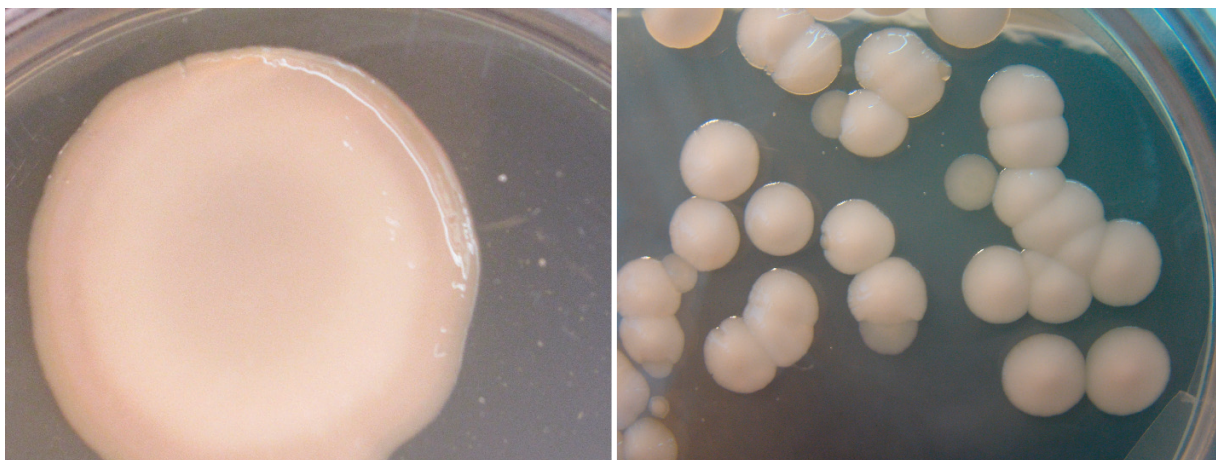


Figura 7.23. *Serratia marcescens* Bizio, 1823



7.3.2. Pseudomonas spp.

Figura 7.24. *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, 1900

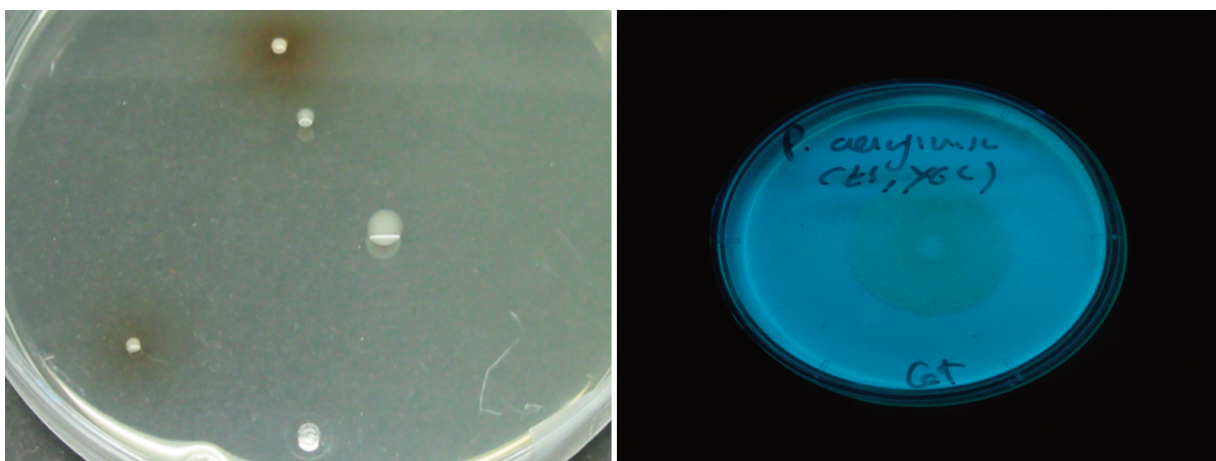


Figura 7.25. *Pseudomonas alcaligenes* Monias, 1928

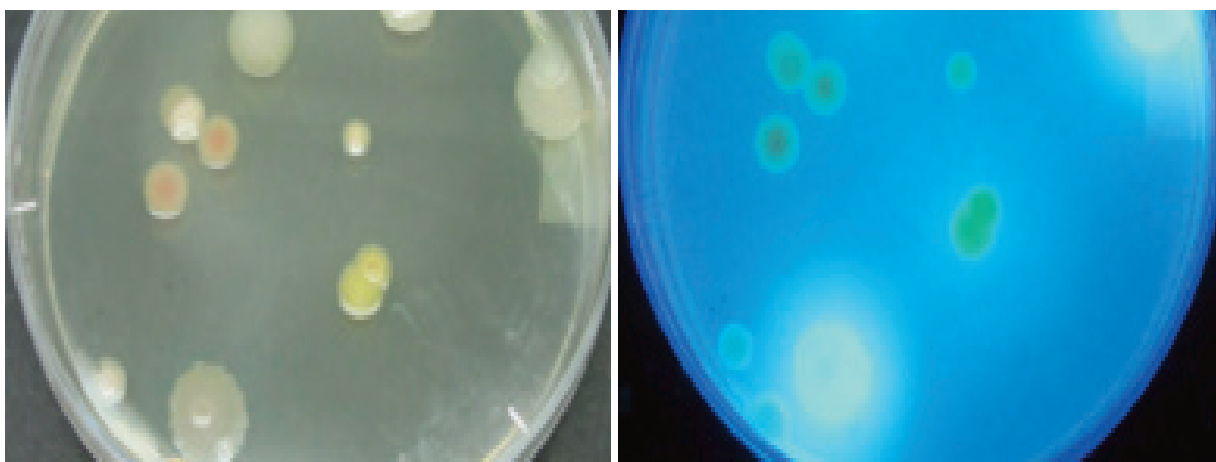


Figura 7.26. *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard & Sauvageau) Bergey et al., 1930

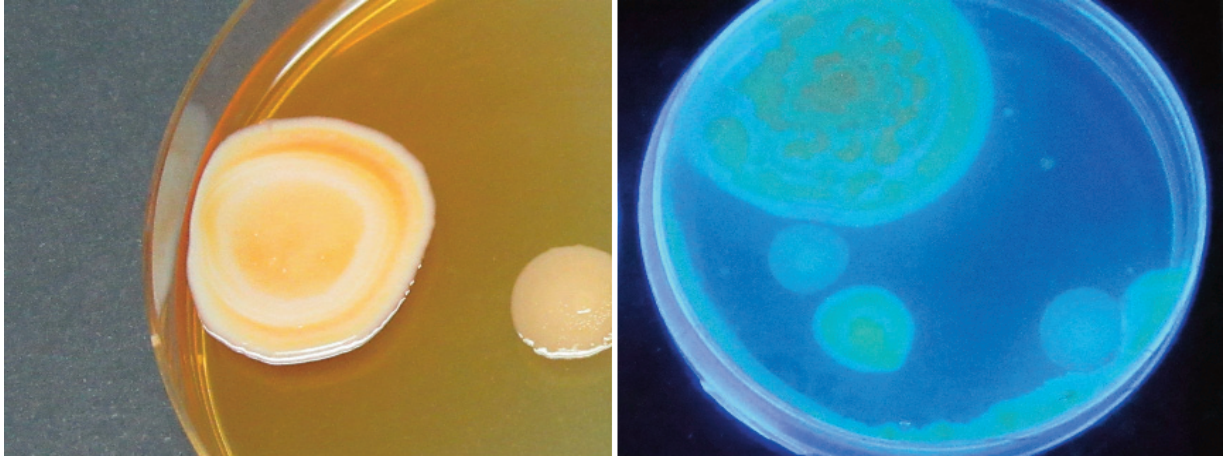


Figura 7.27. *Pseudomonas fluorescens* Migula, 1895

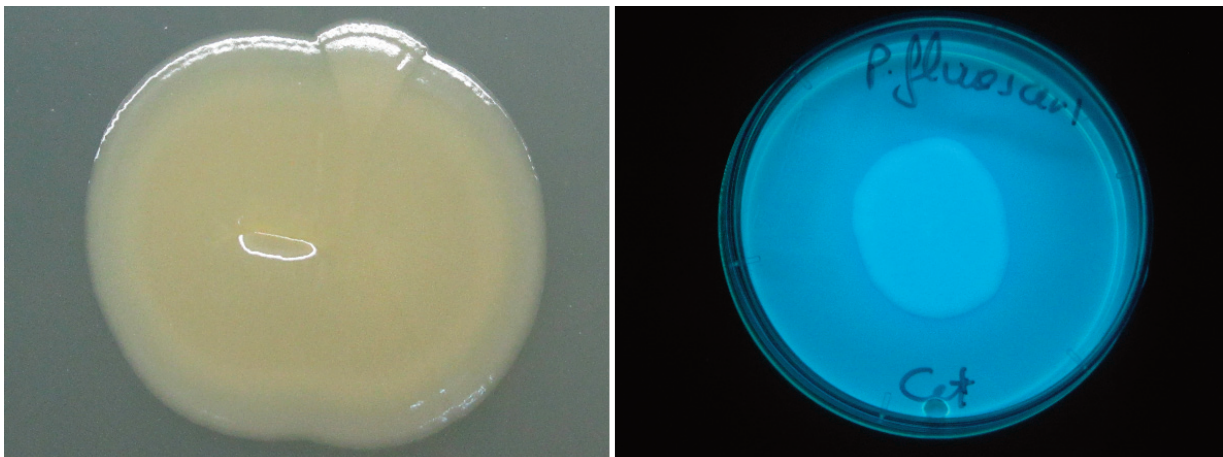


Figura 7.28. *Pseudomonas guariconensis* Toro et al., 2013

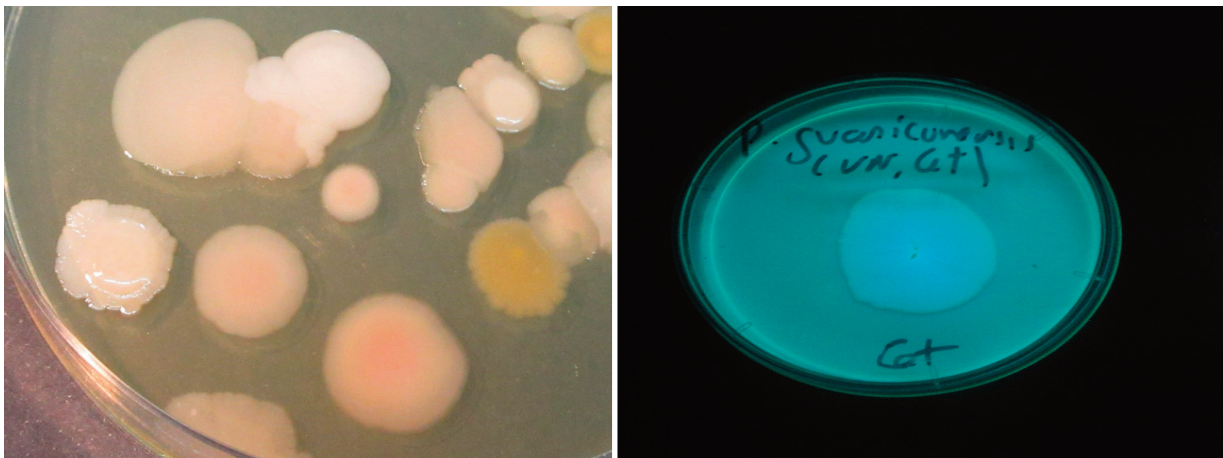
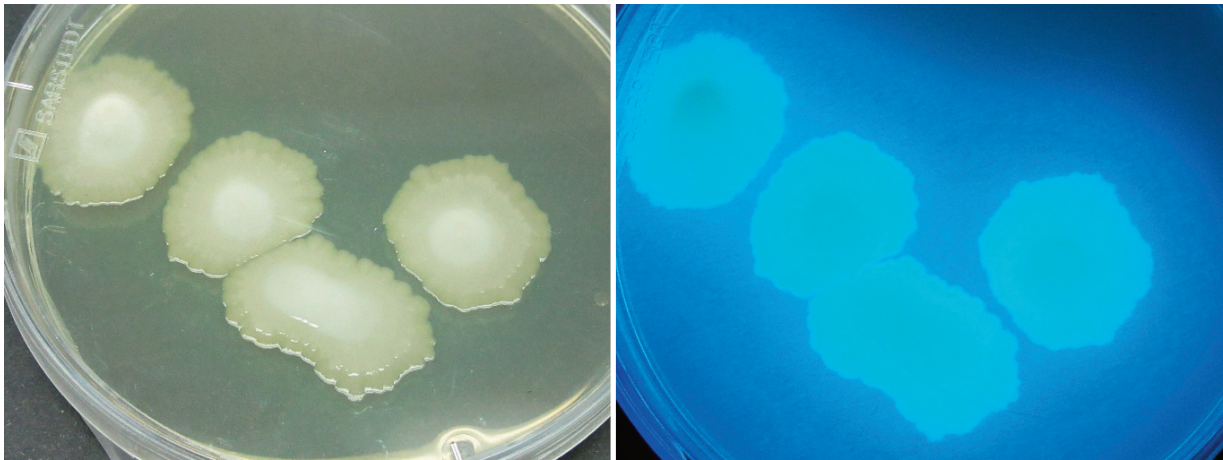


Figura 7.29. *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula, 1895



7.3.3. Hongos

Figura 7.30. *Aaosphaeria arxii* (Aa) Aptroot, 1995

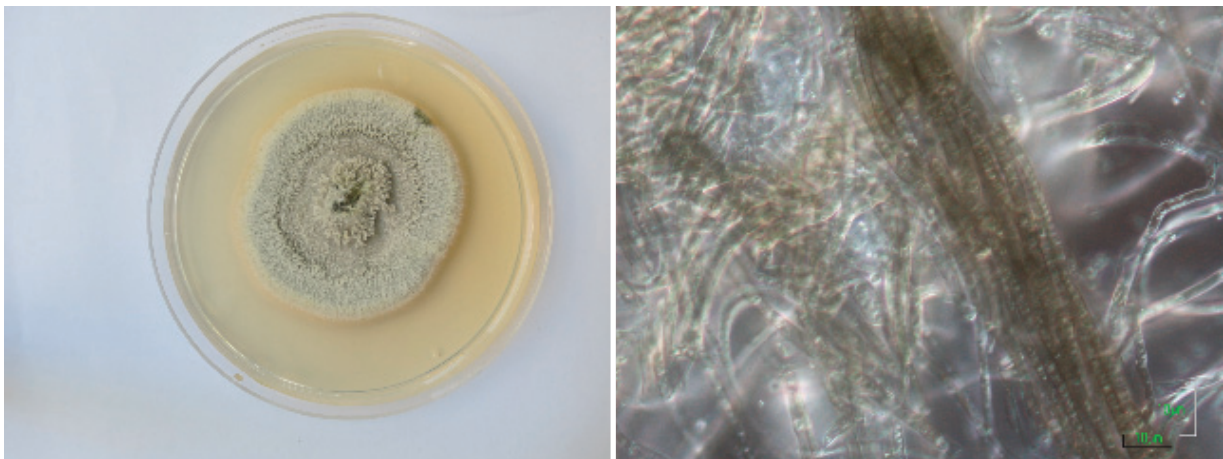


Figura 7.31. *Arthrinium arundinis* (Corda) Dyko & B. Sutton, 1979

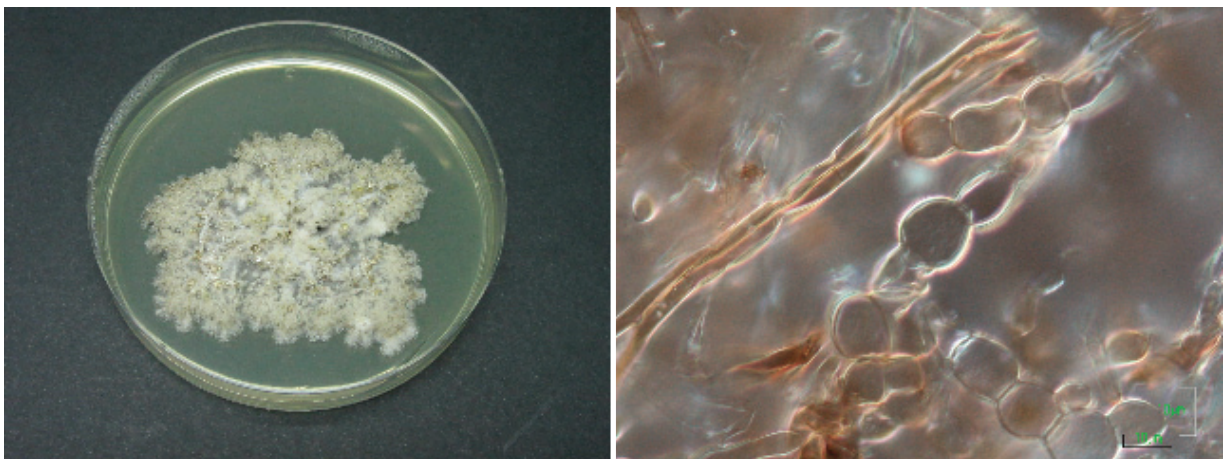


Figura 7.32. *Aspergillus cervinus* Masee, 1914

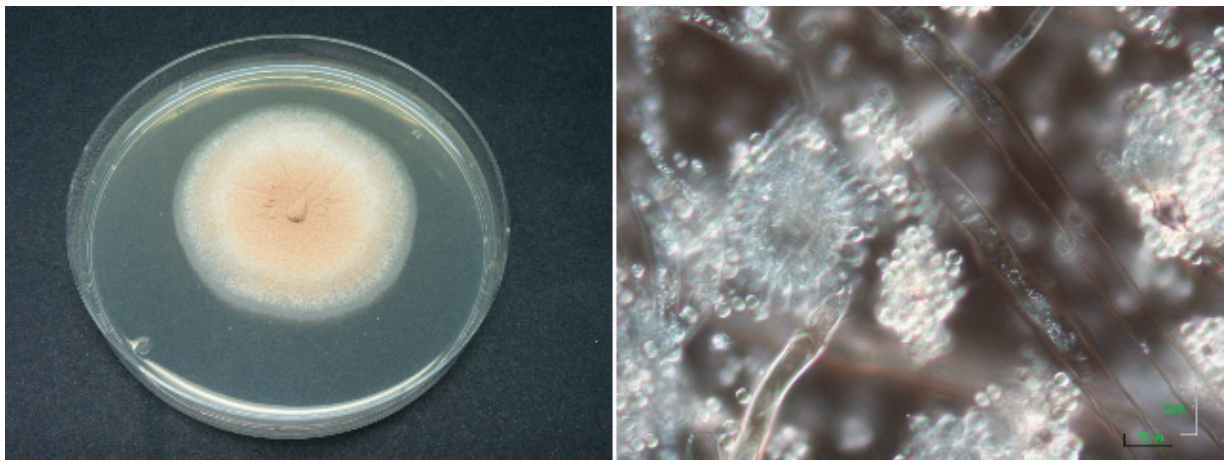


Figura 7.33. *Aspergillus fumigatus* Fresen, 1863

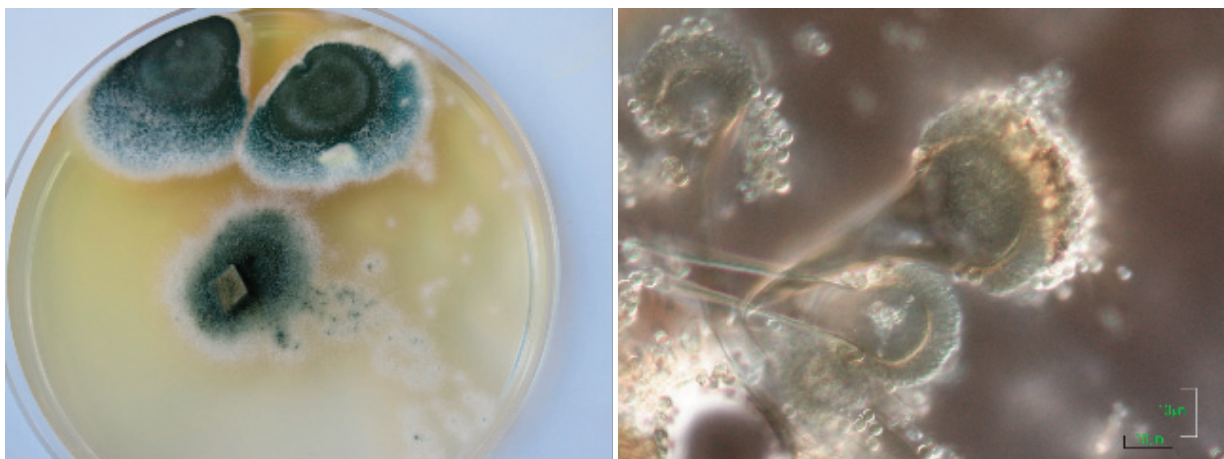


Figura 7.34. *Aspergillus niger* Tiegh, 1867

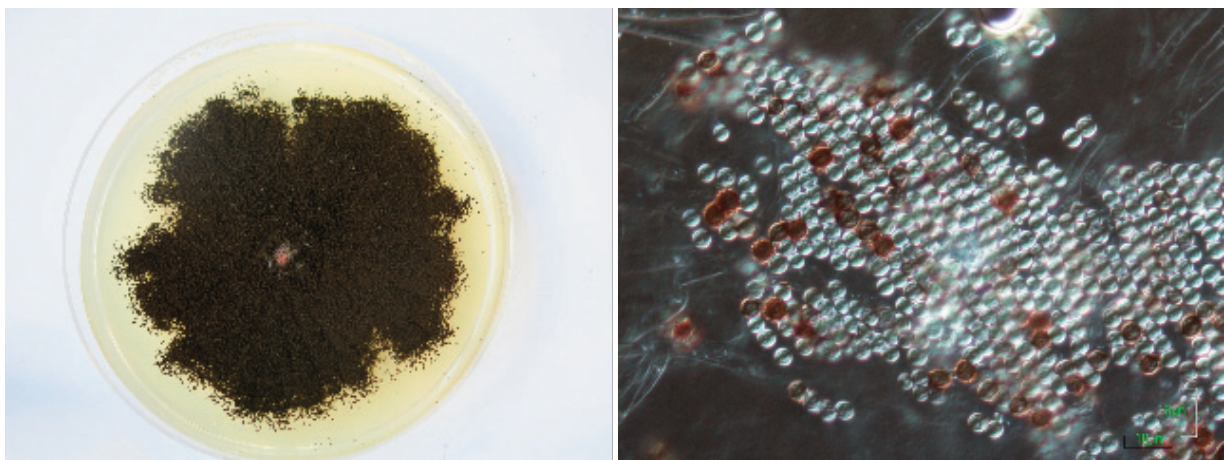


Figura 7.35. *Aspergillus terreus* Thom, 1918

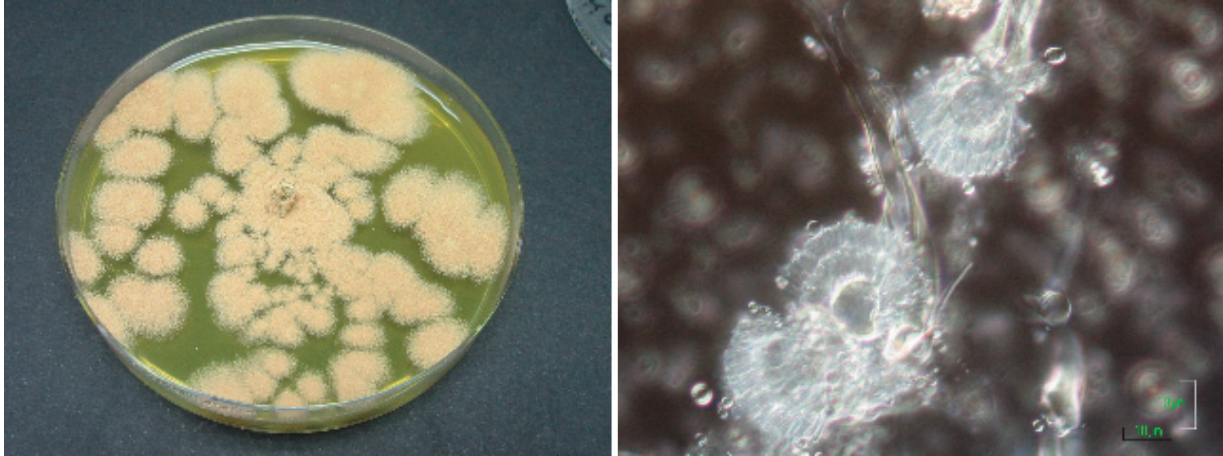


Figura 7.36. *Byssochlamys spectabilis* (Udagawa & Shoji Suzuki) Houbraken & Samson, 2008

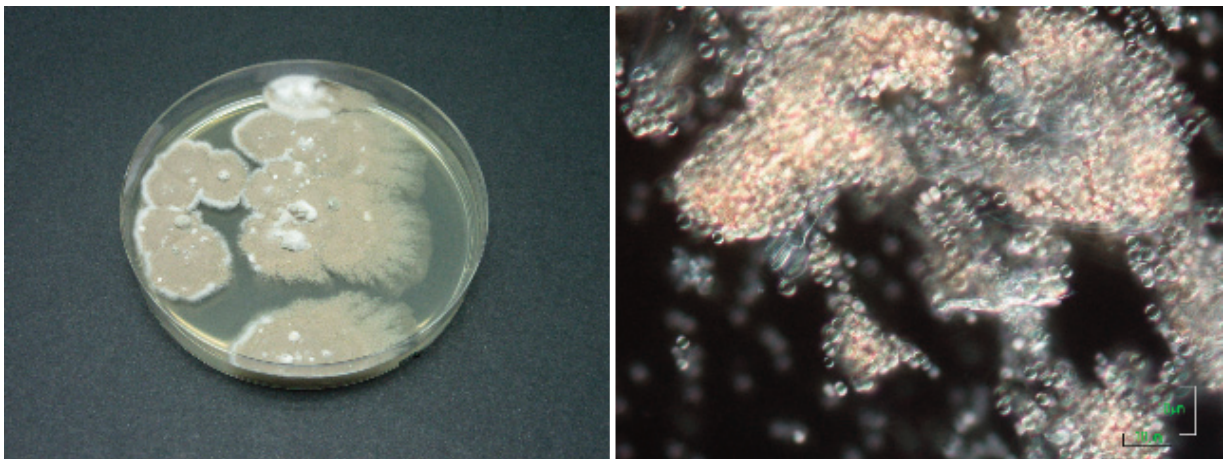


Figura 7.37. *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, 1952

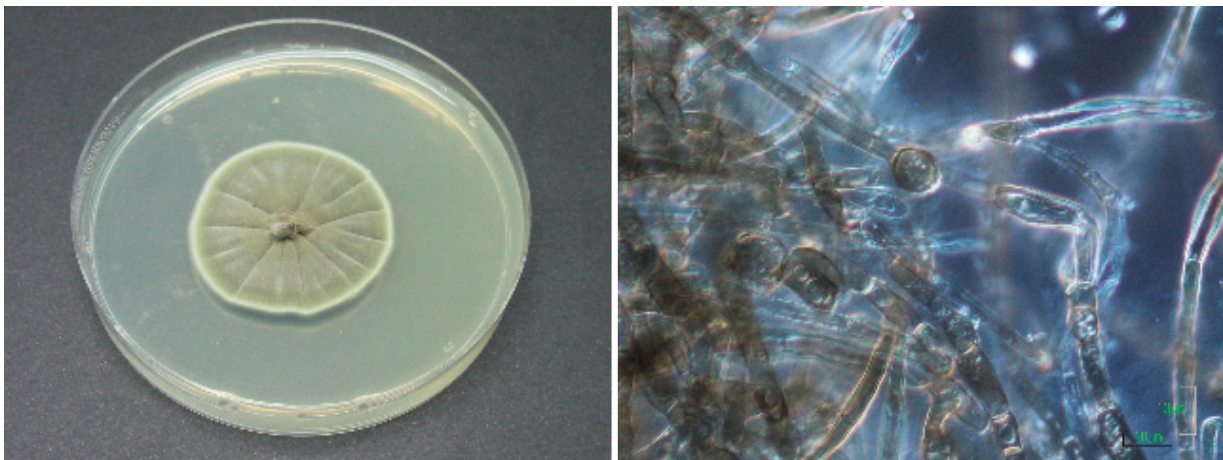


Figura 7.38. *Clonostachys rosea* (Link) Schroers et al., 1999

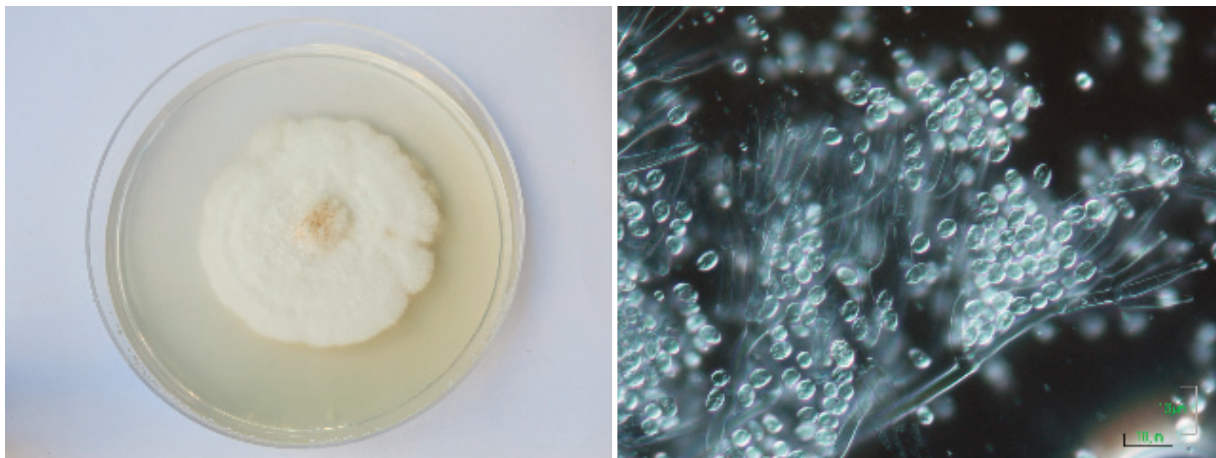


Figura 7.39. *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc, 1892

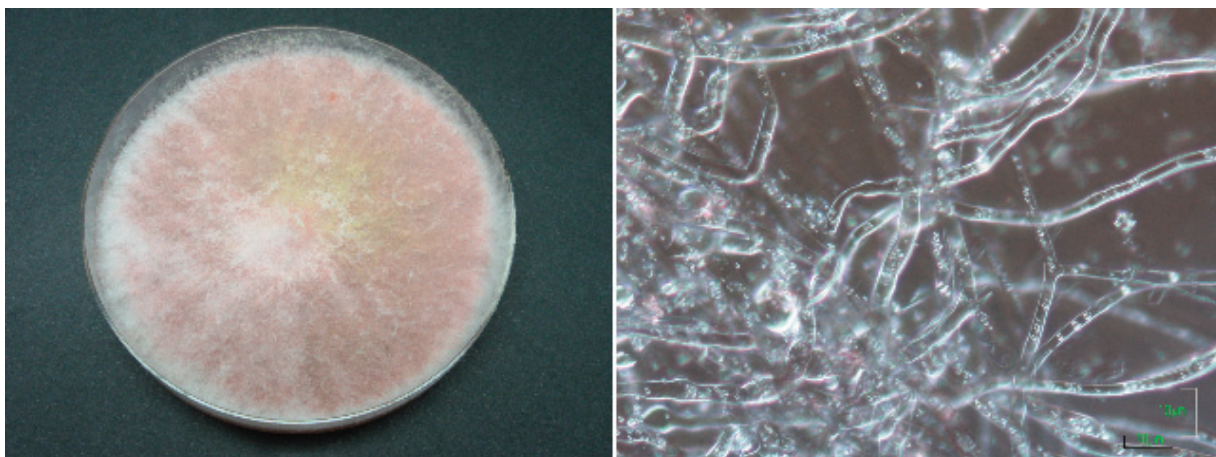


Figura 7.40. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc, 1886

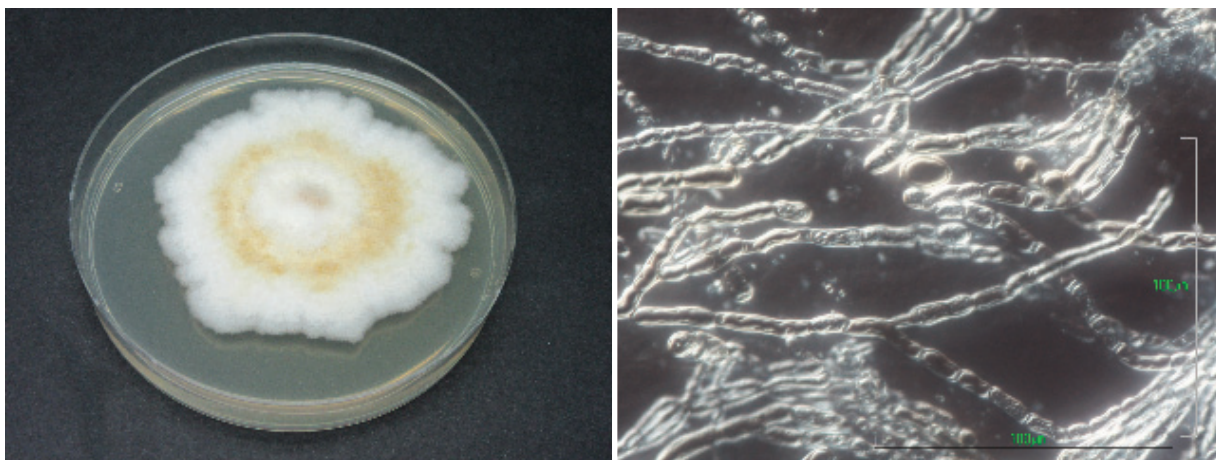


Figura 7.41. *Fusarium oxysporum* Schltdl, 1824

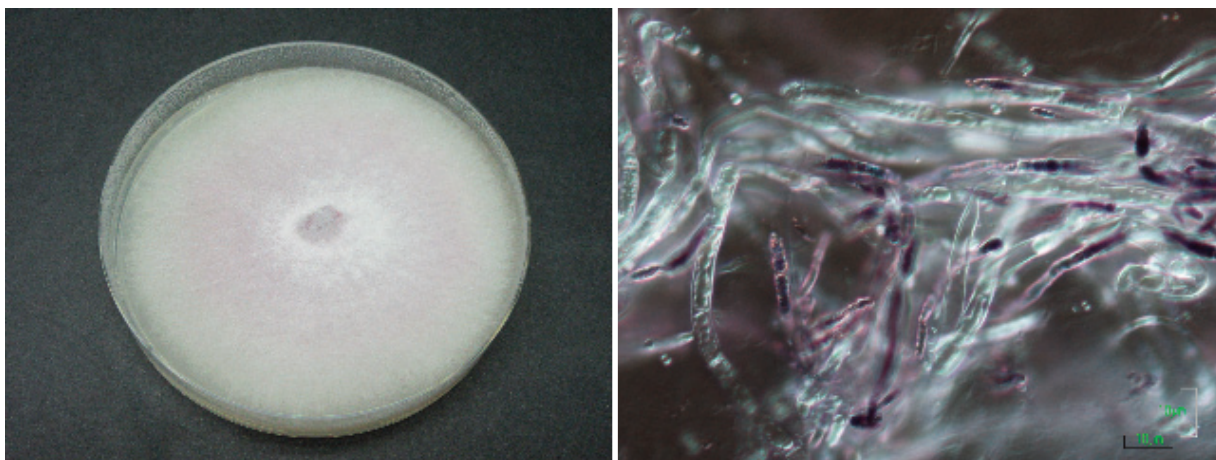


Figura 7.42. *Gliomastix murorum* (Corda) S. Hughes, 1958

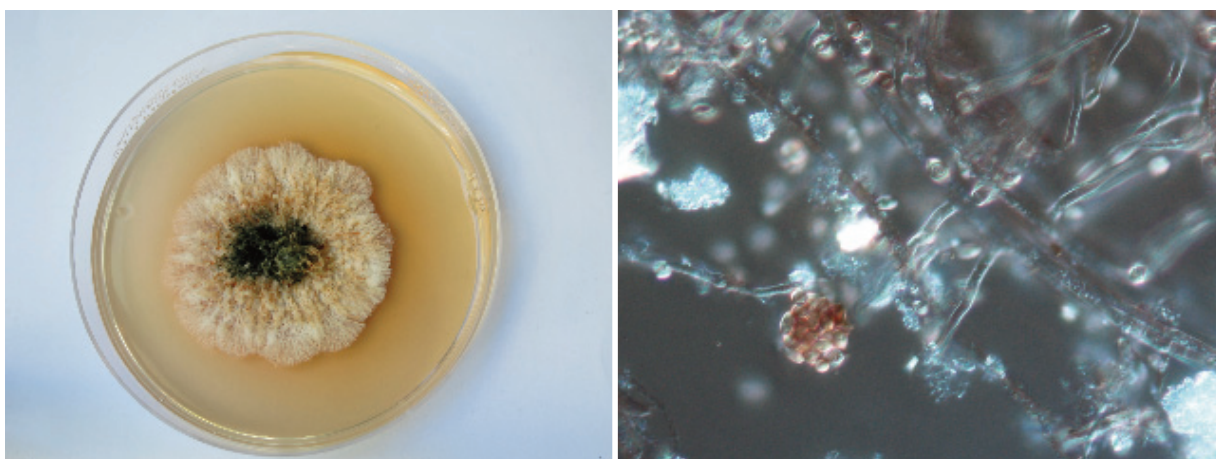


Figura 7.43. *Ilyonectria europaea* A. Cabral, Rego & Crous, 2012

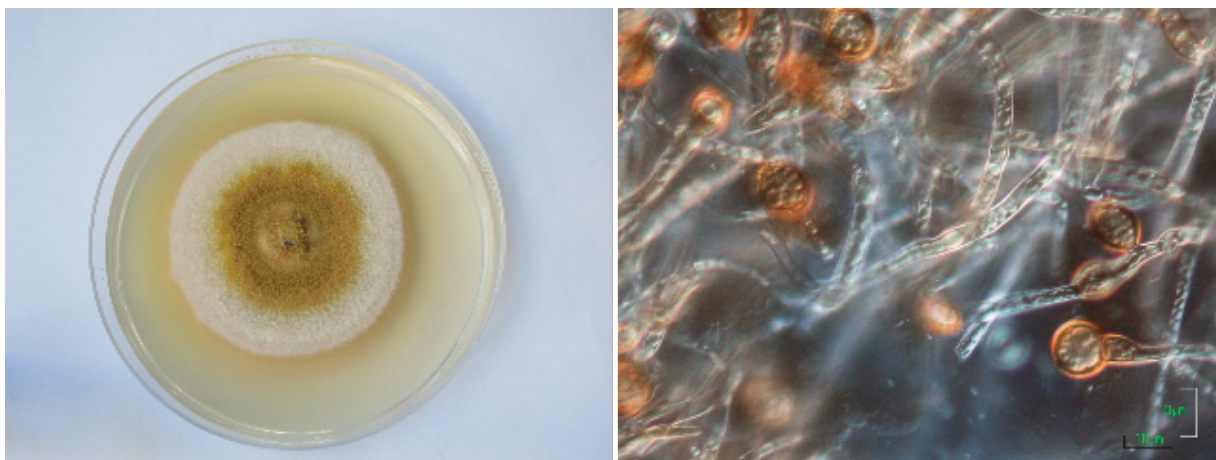


Figura 7.44. *Mucor moelleri* (Vuill.) Lendn, 1908



Figura 7.45. *Penicillium chrysogenum* Thom, 1910

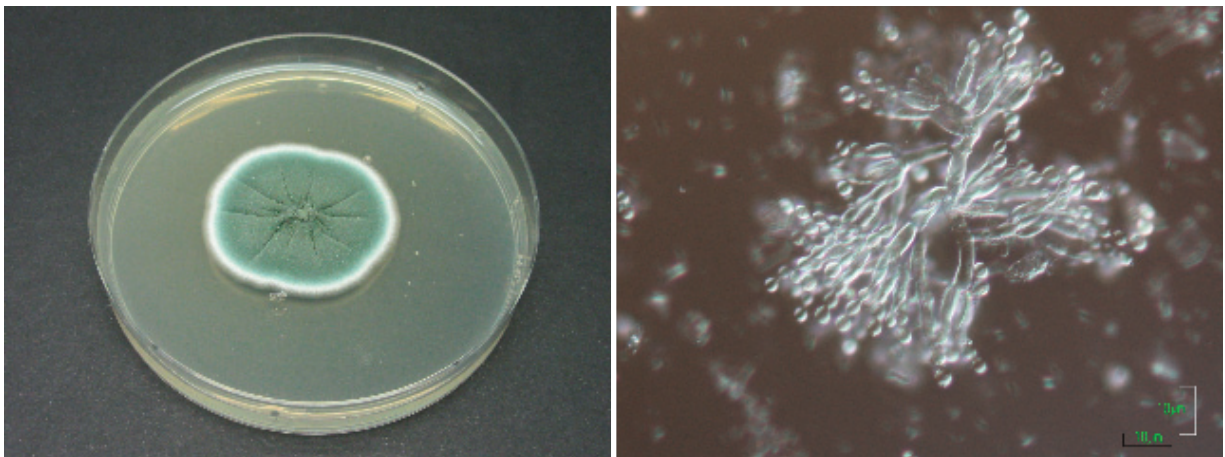


Figura 7.46. *Penicillium concentricum* Samson, Stolk & Hadlok 1976

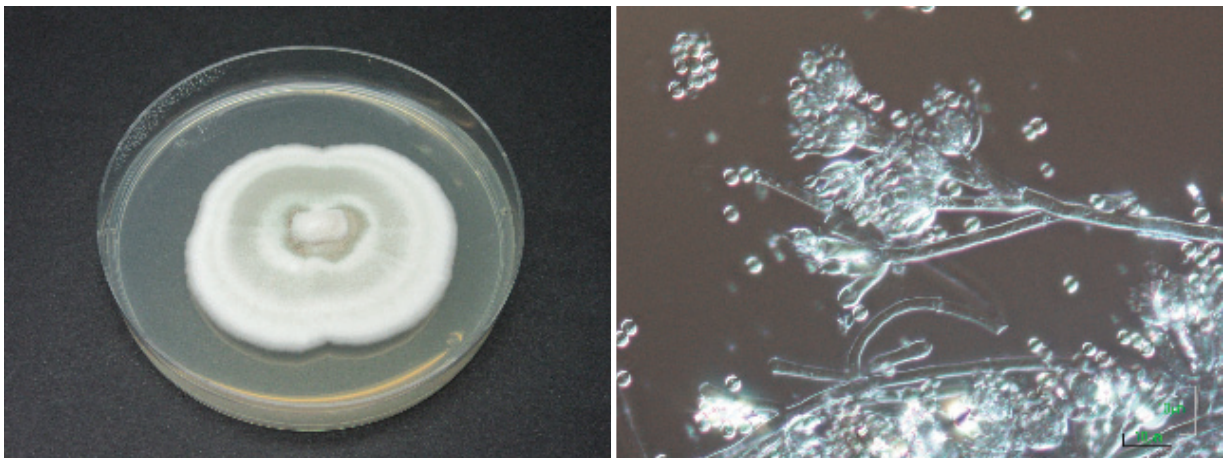


Figura 7.47. *Penicillium murcianum* C. Ramírez & A.T. Martínez, 1981

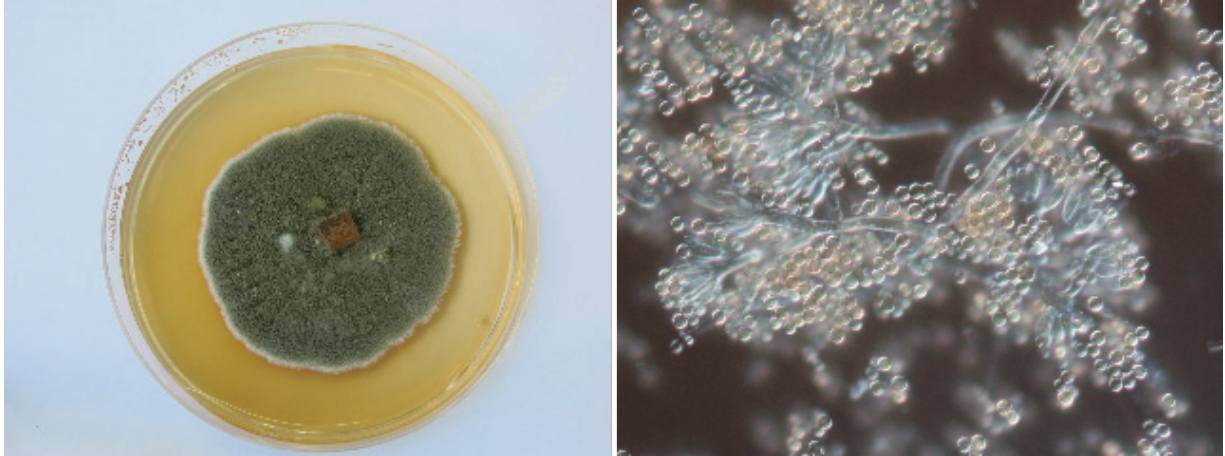


Figura 7.48. *Penicillium sanguifluum* (Sopp) Biourge, 1923

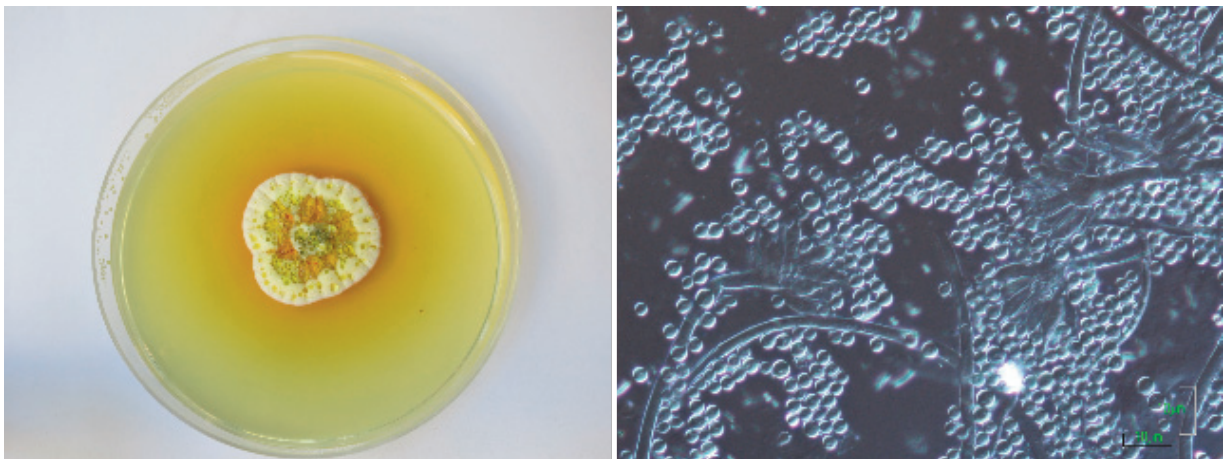


Figura 7.49. *Rhizopus oryzae* (Went & Prins.) Geerl, 1895



Figura 7.50. *Talaromyces wortmannii* C.R. Benj., 1955

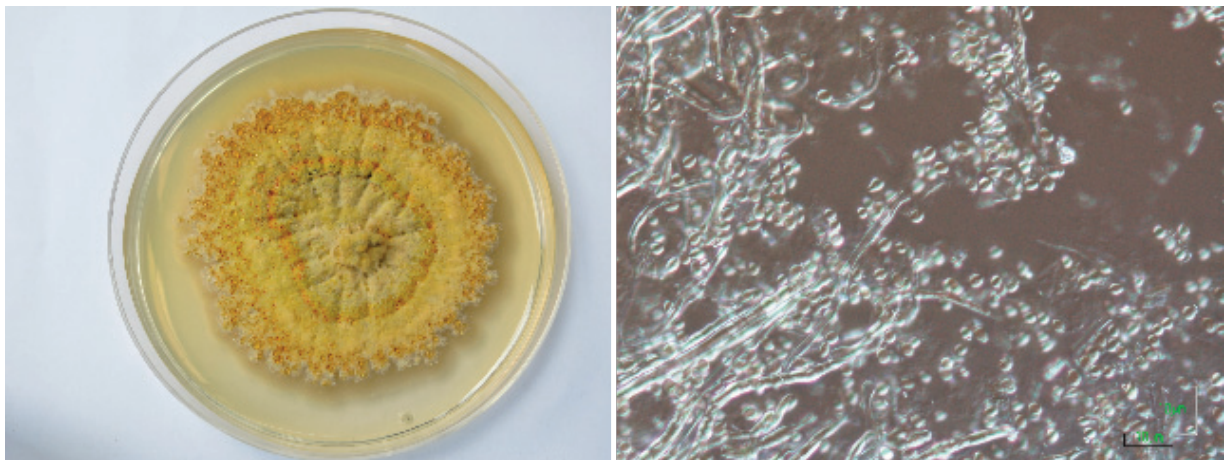


Figura 7.51. *Trichoderma ghanense* (Yoshim. Doi, Y.) Abe & Sugiy, 1987

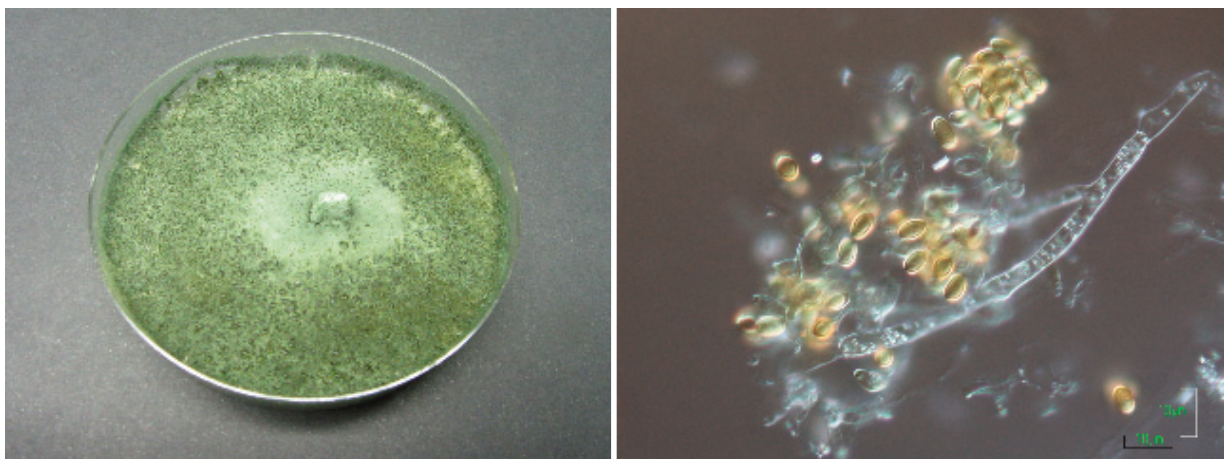


Figura 7.52. *Trichoderma harzianum* Rifai, 1969

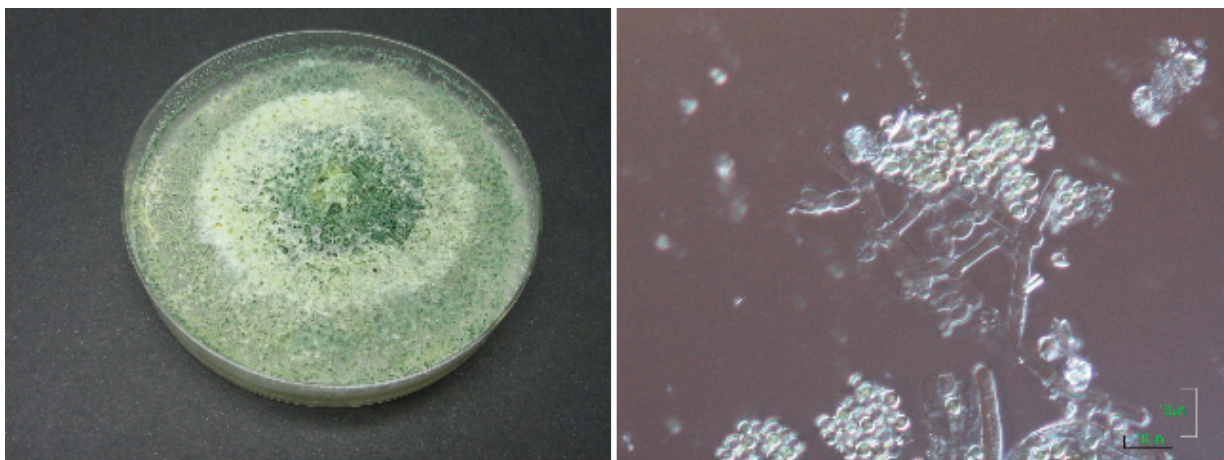


Figura 7.53. *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx, 1987

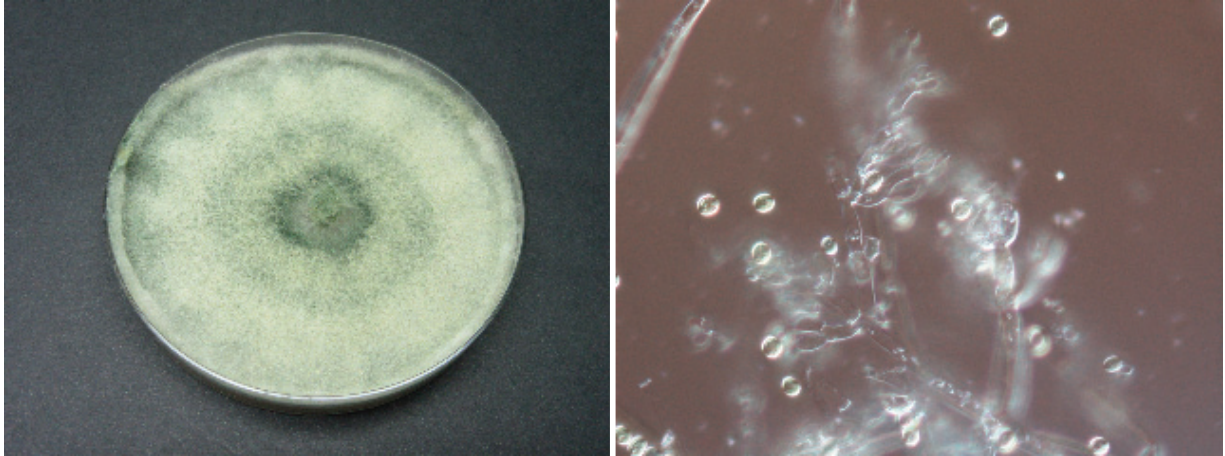
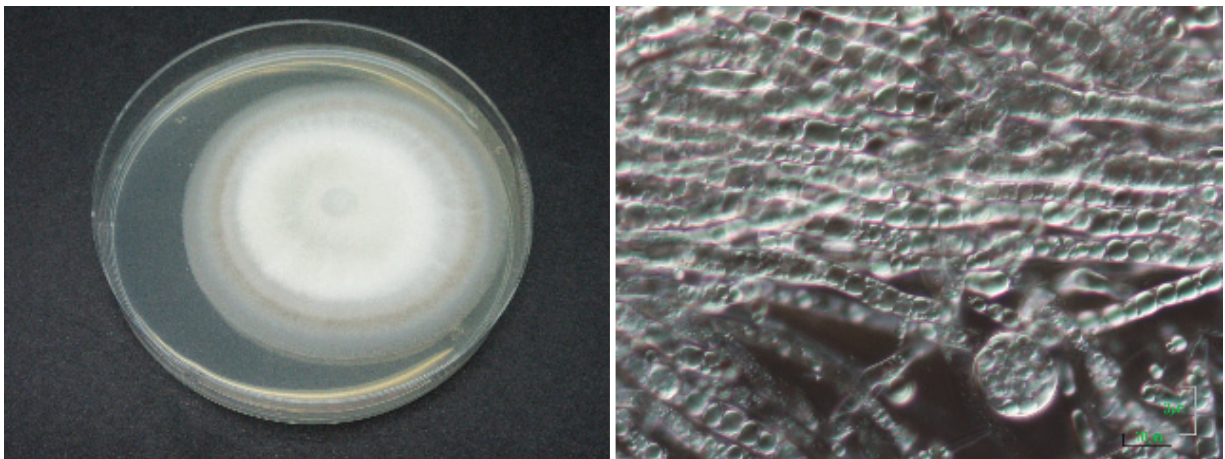
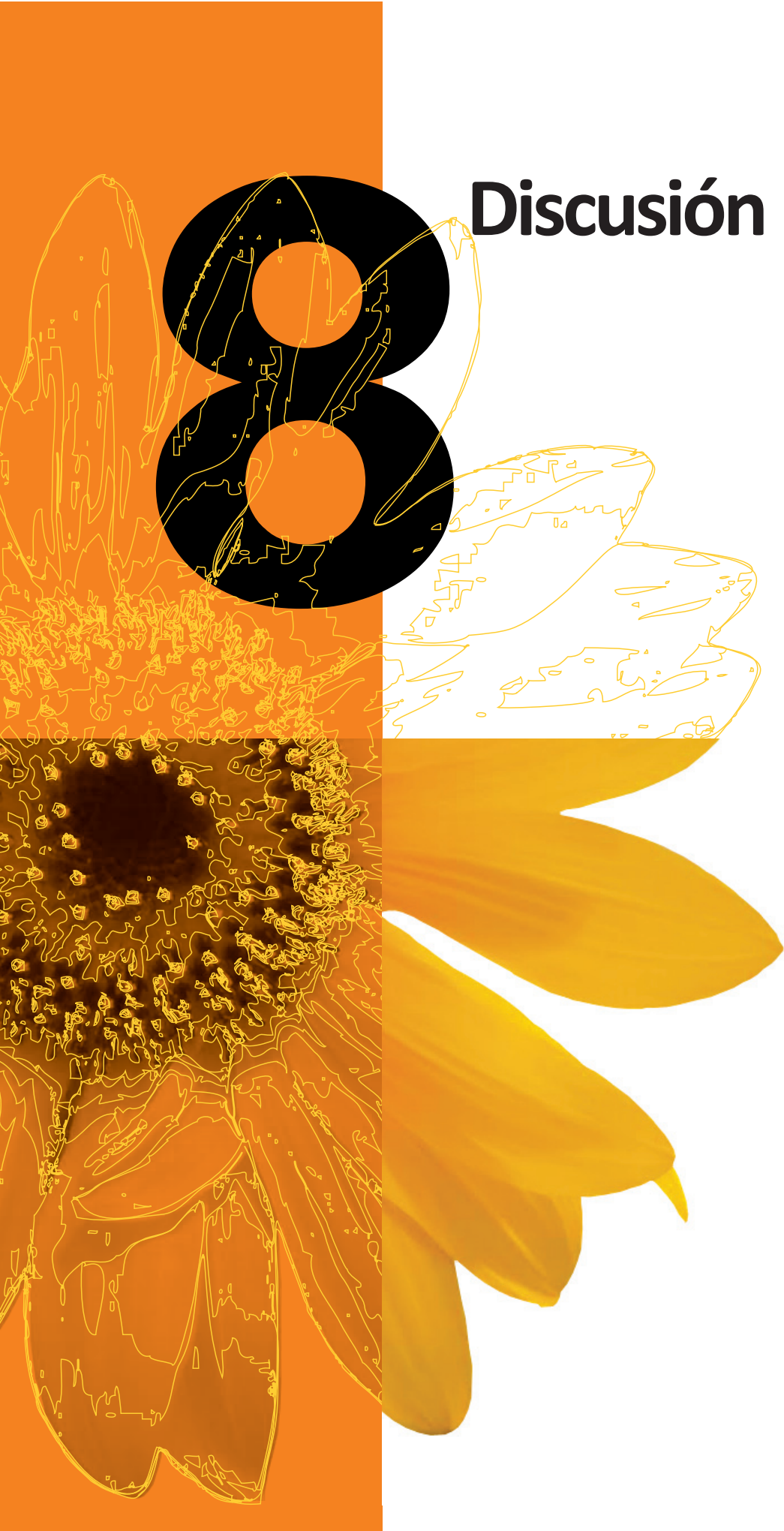


Figura 7.54. *Umbelopsis isabellina* (Oudem.) W. Gams, 2003





Discusión



8.1. SINGULARIDADES DEL TÉ DE COMPOST

El TCA evaluado en este trabajo es una matriz líquida y orgánica, que contiene una baja concentración, tanto de macro y micronutrientes, como de vitaminas, pero cuya importancia principal radica en que contiene una concentración oportuna de microorganismos de diferentes géneros, que coexisten actuando de forma sinérgica, lo que incrementa los beneficios para las plantas a las que se aplica. Los microorganismos más abundantes del TCA utilizado son, en orden decreciente de abundancia: *Bacillus* (40,4%), *Ochrobactrum* (24,5%), *Pseudomonas* (17,7%), *Gordonia* (15,8%) y *Serratia* (1,6%). Esta composición es similar a la descrita para téis provenientes del compostaje de paja de arroz, vermicompost y corteza de ciprés, en el que los géneros dominantes fueron *Bacillus* (63%), *Ochrobactrum* (13%) y *Sphingomonas* (6%) (Kim *et al.*, 2015). Todos los géneros mencionados pertenecen a las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Los hongos, aunque sólo suponen un 1%, dan también valor al producto, puesto que se trata principalmente de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, también promotores del crecimiento vegetal (PGPF). Ambos grupos de microorganismos se engloban bajo el nombre genérico de Promotores del crecimiento vegetal (PGP). En una revisión realizada por Adesemoye & Kloepper (2009) sobre los beneficios derivados de las interacciones planta-PGPs, destacan la mejora en la tasa de germinación de las semillas, la estimulación del desarrollo radical, la mejora de la toma de nutrientes y de la conductividad hidráulica, el aumento del área foliar, del contenido en clorofila y en proteínas y, en consecuencia, el incremento de la biomasa, tanto de la raíz como de la parte aérea, y de la producción. La promoción del crecimiento es un fenómeno complejo raramente atribuible a un único mecanismo y por lo general, la influencia ejercida por los microorganismos sobre el crecimiento vegetal y la productividad ocurre a través de múltiples mecanismos, por lo que, el efecto puede producirse por medio de interacciones de unos microorganismos con otros (Haggag *et al.*, 2015) y no por un único microorganismo, lo que constituye la base fundamental del TCA. Los microorganismos presentes en el TCA poseen interés medioambiental: en el suelo, las bacterias son un importante sumidero de macro y micronutrientes, que incorporan bien mediante la vía asimilatoria (asimilación de N como aminoácidos) o mediante procesos respiratorios (como la nitrificación/desnitrificación); además, son capaces de descomponer compuestos recalcitrantes debido a la gran diversidad de metabolismos que presentan; com-

pactan y favorecen la humedad del suelo mediante la formación de agregados o biofilms. Los hongos, por su parte, también son una fuente de elementos gracias a su acumulación en el micelio, principalmente de calcio; los hongos de podredumbre blanca son capaces de descomponer compuestos tóxicos y recalcitrantes (Ingham, 2005) y algunas especies son bioacumuladoras de metales. Esto hace que los téis de compost sean un agregado ideal para suelos áridos y/o sobreexplotados, donde el manejo convencional haya mermado las poblaciones microbianas.

Kim y colaboradores, en su estudio de 2015, estimaron que la concentración óptima de los téis de compost procedentes de hierbas medicinales y vermicompost usados en sus estudios estaba en el rango de $1,5$ a $5,3 \cdot 10^7$ UFCs/mL para las bacterias y de $8,7$ a $24,7 \cdot 10^3$ UFCs/mL para los hongos. En nuestro trabajo, el TCA presenta una concentración total de microorganismos mesófilos aerobios de $2,5 \cdot 10^6$, inferior a los valores mencionados, pero que según Ingham (2005) puede ser considerado adecuado para un té de compost (TC) de calidad.

La reducida concentración de nitrógeno que poseen los TCs, especialmente si parten de material exclusivamente vegetal, podría generar dudas en cuanto a la eficacia del empleo de este tipo de insumos como fertilizante; sin embargo, se ha estimado que sólo entre un 10% y un 40% del nitrógeno aplicado en campo por fertilización convencional es asimilado por las plantas, lo que significaría que entre el 60% y el 90% se pierde por lixiviado del nitrato o por volatilización de amoníaco o de óxido nítrico, uno de los principales gases de efecto invernadero, durante los procesos de nitrificación y desnitrificación (Adesemoye *et al.*, 2009). Las concentraciones de nitrógeno del TCA, así como su modo de acción, difieren de la fertilización convencional en un punto esencial: El nitrógeno aplicado de esta manera se libera por etapas. Al fertilizar con TCA, se aplica un 0,02% de nitrógeno en forma amoniacal, que llega a las plantas y a los microorganismos directamente; sin embargo, el nitrógeno en forma orgánica se va liberando poco a poco a medida que va sufriendo procesos oxidativos, de forma que las concentraciones de este nutriente presentes en el suelo no son superiores a la tasa de asimilación y, por tanto, se reduce la lixiviación de este elemento.

En el contexto del cambio climático, del aumento de las preocupaciones ambientales y del aumento de la población, la aplicación de métodos alternativos de fertilización ofrece importantes herramientas para lograr

una producción sostenible de alimentos (Le Mire *et al.*, 2016), mediante la reducción del uso de fertilizantes de síntesis química y su consecuente disminución en suelos agrícolas, lo que llevaría a reducir el nivel de contaminación ambiental (Haggag *et al.*, 2015). Es por ello que la utilización de los TCs se plantea como un complemento o una alternativa a la fertilización convencional, pero debido a que, su grado de eficacia puede variar por estar condicionado por el tipo y calidad del sustrato utilizado, por el método de elaboración y por las características físico-químicas, nutritivas y biológicas que tenga el producto final (Weltzien, 1991, Naidu *et al.*, 2013), es necesario demostrar tanto su inocuidad como su efectividad mediante estudios de eficacia a diferentes niveles, tanto en laboratorio como en campo.

Fitotoxicidad del TCA

Los resultados obtenidos en los bioensayos de germinación en función de la dosis de TCA aplicada mostraron, no sólo que las dosis más efectivas a la hora de fertilizar fueron las diluciones 1/5 y 1/10, sino que en ningún caso se observaba la aparición de fitotoxicidad, que habría sido detectada por ausencia de crecimiento de la parte aérea y/o radicular de las semillas o mediante síntomas de respuesta hipersensitiva en la superficie de las semillas. En la bibliografía existen pocos estudios sobre los efectos de la aplicación de diferentes diluciones de los tés de compost, siendo principalmente estudiados los tés de compost no aireados o TCN. Elad & Shtienberg (1994) y (Yohalem *et al.*, 1994) realizaron estudios del efecto de las diluciones en invernadero y en laboratorio. Los primeros llevaron a cabo sus estudios en invernadero sobre el follaje de plantas de pimiento y tomate diluyendo 1/5 y 1/25, encontrando diferencias en su aplicación, mientras que los segundos, realizaron un estudio *in vitro* acerca de la inhibición de la germinación de conidios de *Venturia inaequalis* utilizando diluciones 1/10 y 1/100 entre las que no existieron diferencias en cuanto a potencial inhibidor.

Tampoco Scheuerell & Mahaffee (2002) encontraron evidencias de que los tés de compost causaran fitotoxicidad ni mediante aplicación foliar, ni mezclado con el sustrato en macetas; sin embargo, (Carballo *et al.*, 2009) detectaron en sus ensayos en semillas de lechuga que la aplicación de TCs causaba un efecto negativo en el crecimiento de la radícula, aunque resultaba beneficioso en el posterior crecimiento de la plántula, excepto cuando se aplicaba en concentraciones elevadas. También remarcaron que la aireación y la temperatura

durante la producción, así como la madurez del producto final resultaban factores cruciales para que un TC resultara fitotóxico, viéndose favorecidos en este sentido los TCAs, que son producidos con aireación continua y a baja temperatura, que precisamente son las condiciones que se dan en el caso del TCA objeto de estudio.

La realización de los bioensayos con cada una de las 12 cepas bacterianas más representativas del TCA permitió comprobar que ninguna de ellas presentaba fitotoxicidad y que la gran mayoría tenían efecto fitoestimulante. Las mismas especies bacterianas no ejercieron el mismo efecto promotor en guisante y rábano, pero, en mayor o menor grado, casi todas las especies testadas promovieron el crecimiento vegetal, superando los valores del tratamiento control; las excepciones fueron *Bacillus subtilis* y *B. velezensis* en rábano o *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens* en guisante, pero en cuanto al porcentaje de germinación relativo, *P. aeruginosa* fue la única cepa que no estimuló el crecimiento de raíz de las semillas de rábano.

8.2. EFECTO EN PLANTA

Crecimiento y fisiología

Aunque no se encuentran tan estudiados como los no aireados, existen evidencias bibliográficas que demuestran que los tés de compost aireados promueven, entre otros procesos, la germinación de las semillas, la elongación de la raíz y la producción de biomasa cuantificada como peso seco de la raíz (Scheuerell & Mahaffee, 2002). Sin embargo, no todos los tés de compost ejercen el mismo efecto sobre las plantas a las que se les aplica, debido a su diferente composición, consecuencia de una diferente metodología de producción (Weltzien, 1991).

En este trabajo se ha podido comprobar que, de forma general, el riego periódico con el TCA favorece el crecimiento de diferentes plantas ensayadas, viéndose incrementado, con respecto a la fertilización convencional, el desarrollo general del cultivo, en especial parámetros como la altura, el diámetro del tallo y de la copa, así como el grado de desarrollo del sistema radical.

Son numerosos los trabajos, tanto de laboratorio como de campo, en los que se describen efectos estimulantes obtenidos a nivel de crecimiento y de producción al aplicar diferentes inoculantes bacterianos. Por ejem-

plo, la inoculación con diferentes cepas de *Pseudomonas* produce un incremento del crecimiento tanto de la raíz como de la parte aérea en plantas como colza, lechuga, tomate (Hall *et al.*, 1996, Glick *et al.*, 1997) o granado (Aseri *et al.*, 2008). En trigo, la producción se incrementa en un 30% con la inoculación de *Azotobacter* y en más de un 43% al inocular con especies de *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989). En comparación con la utilización de inóculos específicos por separado, los TCs están mucho menos estudiados, habiéndose descrito un incremento del crecimiento, tanto de la parte aérea como de la raíz, y del contenido en nutrientes tras su aplicación en melón (Naidu *et al.*, 2013), col china (Pant *et al.*, 2012), tomate (Xu *et al.*, 2012) y fresa (Hargreaves *et al.*, 2009).

La estimulación del crecimiento inducida por diferentes PGPRs es debida, en algunos casos, a la producción de reguladores del crecimiento vegetal, como por ejemplo el Ácido Indolacético (IAA), descrito en *Bacillus subtilis* (Idris *et al.*, 2004), *Pseudomonas putida* (Patten & Glick, 2002), *P. aeruginosa* (Ahemad & Khan, 2011, 2012) y *Serratia marcescens* (Selvakumar *et al.*, 2008), o Giberelinas (GA), caso de *B. pumilus* y *B. licheniformis* (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001). También puede deberse a un descenso en el contenido de etileno, que, como se ha visto en *B. safensis* (Lateef *et al.*, 2015), *P. putida* (Cheng *et al.*, 2007), *P. aeruginosa* (Ganesan, 2008) o *P. fluorescens* (Shaharoon *et al.*, 2008), ocurre por medio del enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) desaminasa, que, al hidrolizar el ACC, precursor inmediato del etileno, reduce la concentración de esta fitohormona (Glick *et al.*, 2007) y por lo tanto su efecto inhibitorio en el crecimiento vegetal, generando amonio en el proceso, que serviría de fuente de N para la rizosfera.

Tanto el IAA como las GAs controlan una amplia gama de funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas y actúan como un componente clave en la configuración de la arquitectura de la raíz, ya que influyen en la diferenciación del tejido vascular, el elongamiento celular, la regulación de la formación de raíces laterales, el posicionamiento de los pelos radicales o el gravitropismo radical (Aloni *et al.*, 2006, Pant *et al.*, 2012) y, como consecuencia, se incrementa la superficie de absorción, lo que mejora la tasa de absorción de agua y nutrientes del suelo (Adesemoye *et al.*, 2009). Pero además de un aumento de la superficie de absorción radical, en la estimulación del crecimiento de la planta también juegan un papel importante el incremento de la disponibilidad de nutrientes por medio de la fijación biológica de N (Adesemoye & Kloepper, 2009) y de la

mineralización de P y K (Amir *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2005, Canbolat *et al.*, 2006).

El nitrógeno, que forma parte de las proteínas, de la clorofila, de los ácidos nucleicos y las coenzimas, es esencial para el crecimiento de las plantas. Las raíces solo pueden absorberlo en forma de anión nitrato (muy móvil en el suelo, con tendencia a lixiviarse) o de catión amonio (menos móvil por quedar adsorbido a las partículas de arcilla de los suelos, aunque puede ser oxidado por acción de los microorganismos y puede llegar a ser tóxico a determinadas concentraciones). A pesar de su abundancia, el nitrógeno atmosférico (N₂) sólo puede ser utilizado por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, poseedores del complejo nitrogenasa que cataliza la conversión del N₂ a NH₄⁺ (Kim & Rees, 1994). Estos microorganismos fijadores de nitrógeno se dividen en dos grandes grupos: bacterias y cianobacterias. Esta capacidad fijadora es muy interesante para las plantas, que a lo largo de su evolución han desarrollado asociaciones simbióticas planta-microorganismo para aprovecharse de la misma (Martin *et al.*, 2017), proporcionando fotoasimilados a los microorganismos a cambio de amonio. No obstante, las especies de vida libre, entre otros los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Khan *et al.*, 2009, Estrada *et al.*, 2001), también juegan un papel importante en este proceso, proporcionando amonio directamente al suelo.

El fósforo, que juega un importante papel en los principales procesos metabólicos, como la fotosíntesis, la transferencia de energía, la transducción de señales, la biosíntesis de macromoléculas y la respiración (Khan *et al.*, 2010), así como el desarrollo de la raíz, la fortaleza del tallo, la formación de semillas y flores, la maduración de los cultivos y su producción, la calidad del mismo y la resistencia a enfermedades (Mohammadi, 2012), por lo que es uno de los elementos más limitantes del crecimiento de las plantas. Aunque en la mayoría de los suelos suele ser abundante, su alta reactividad con algunos metales complejos como el Fe, Al y Ca, conduce a la precipitación o a la adsorción de entre un 75 y un 90% (Igual *et al.*, 2001, Gyaneshwar *et al.*, 2002) lo que hace que las concentraciones de este elemento biodisponibles para las plantas sean muy bajas. Es por ello por lo que los cultivos son suplementados con fertilizantes que aportan el fósforo que necesitan las plantas para crecer de forma óptima, lo cual, además de suponer un mayor costo de la producción, supone un importante impacto medioambiental. Como alternativa se plantea la utilización de microorganismos agrupados bajo la denominación de solubili-

zadores de fosfato, que incluye un amplio rango de organismos, principalmente especies de *Rhizobium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como especies fúngicas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Richardson *et al.*, 2009, Pindi & Satyanarayana, 2012). Por medio de la producción de fosfatasas y de ácidos orgánicos, y de la quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos, aumentan su disponibilidad para las plantas (Rodríguez & Fraga, 1999, Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010, Wahyudi *et al.*, 2011).

Tras el nitrógeno y el fósforo, el potasio es el nutriente más importante para el crecimiento vegetal, ya que, entre otros procesos, juega un papel esencial en la activación de enzimas implicados en diferentes procesos fisiológicos como el metabolismo energético, la toma y el transporte de nutrientes, la fotosíntesis o la síntesis de proteínas, almidón, celulosa y vitaminas (Biswas & Basak, 2015) y, además, confiere resistencia a estrés abióticos y bióticos (Srinivasarao & Kundu, 2017), lo que mejora la calidad de los cultivos. Al igual que el fósforo, es un elemento abundante en los suelos, pero más del 90% se encuentra de forma no biodisponible para las plantas. Nuevamente, bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Verma *et al.*, 2017), son capaces de solubilizar potasio y hacerlo disponible para la planta mediante la excreción de ácidos orgánicos (Liu *et al.*, 2012, Prajapat *et al.*, 2013, Etesami *et al.*, 2015).

El cultivo en medios específicos de las diferentes cepas del TCA, ha permitido evaluar su capacidad solubilizadora de sales de fósforo y de potasio, así como de fijación de N, constatando la existencia de un gran potencial de solubilización en la mayoría de las cepas bacterianas y la eficiencia de algunas de ellas como fijadoras de N. Los mejores índices los presentaban *Ochrobactrum tritici* y *Pseudomonas fluorescens*. Pero, otras especies también demostraron buena capacidad de solubilización, es el caso de la mayoría de las especies de *Bacillus* y de *Pseudomonas*. Especialmente llamativa fue la eficiencia demostrada por *Serratia marcescens* capaz tanto de solubilizar fosfatos y K como de fijar N. Varios de los microorganismos más abundantes encontrados en el TCA han sido destacados por diferentes autores por presentar actividades promotoras del crecimiento. Así, entre el género *Pseudomonas*, las especies *P. putida*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* se han señalado por producir fitohormonas, tener actividad ACC desaminasa y capacidad solubilizadora de fosfato (Patten & Glick, 2002, Jeon *et al.*, 2003, Pandey *et al.*, 2006, Cheng *et al.*, 2007, Ganesan, 2008, Shaharoon

et al., 2008, Ahemad & Khan, 2011, 2012). *Serratia marcescens* por producir IAA (Selvakumar *et al.*, 2008) y solubilizar fosfato (Hameeda *et al.*, 2008); *B. licheniformis* y *B. pumilus* por producir fitohormonas (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001) y tener capacidad de solubilizar potasio (Verma *et al.*, 2017), *B. safensis* por tener actividad ACC desaminasa (Lateef *et al.*, 2015) y *Bacillus subtilis* por ser capaz de fijar N, además de solubilizar fosfato, sintetizar IAA y poseer actividad ACC desaminasa (Iqbal *et al.*, 2018).

No solo son las bacterias las potenciales implicadas en la mejora del crecimiento vegetal. Aunque en mucho menor grado, también hay una implicación por parte de los hongos, principalmente especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium*, además de *Rhizopus*, *Mucor* y *Fusarium*. Como se puede encontrar en diferentes trabajos, todos ellos son típicos habitantes de un compost producido adecuadamente (Anastasi *et al.*, 2005, Ashraf *et al.*, 2007, Pérez *et al.*, 2010), y pueden favorecer la fertilidad del suelo y estimular el crecimiento de las plantas. Así, se ha descrito la capacidad de promotora de crecimiento y de producción de fitohormonas, en concreto giberelinas del género *Cladosporium* (Hamayun *et al.*, 2009). Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, junto con *Trichoderma*, están entre los más frecuentemente descritos como promotores fúngicos del crecimiento vegetal, destacando entre sus efectos una mejora significativa de la germinación, del vigor de la planta, de la producción de biomasa, el desarrollo de pelos radicales, la eficiencia fotosintética, la floración y la producción. Algunas cepas pueden, además, controlar el crecimiento de patógenos foliares y de raíz por medio de la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta. Todo ello es posible gracias a la capacidad que tienen de incrementar la toma de nutrientes y producir fitohormonas, así como a la reprogramación de la expresión de genes, por medio de la activación diferencial de las rutas de señalización de la planta (Hossain *et al.*, 2017). Además, participan activamente en la mineralización del fósforo orgánico a través de la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas, tanto extracelulares como intracelulares (Gómez-Guiñan, 2004), por lo que su presencia favorece la absorción de fósforo por parte de la planta.

Por lo tanto, la gran mayoría de las especies presentes en el TCA pueden ser consideradas como potenciales PGP, que, además, gracias a su actividad metabólica como fijadores y/o solubilizadores, proporcionarían una mayor disponibilidad de nutrientes a las raíces y, en consecuencia, su aplicación contribuiría a favorecer la nutrición de los cultivos. Su aplicación como biofer-

tilizante resultaría especialmente beneficiosa en el caso del P, que, como se ha mencionado, se vuelve un recurso limitante para el crecimiento de los cultivos por su escasa biodisponibilidad (Chen *et al.*, 2006).

La mayor parte de la bibliografía consultada sobre el efecto producido por los TCs en planta hortícola y ornamental versa sobre los beneficios de su aplicación para prevenir o disminuir los daños por agentes fitopatógenos (Litterick *et al.*, 2004, Scheuerell & Mahaffee, 2006, Siddiqui *et al.*, 2009, Koné *et al.*, 2010, St. Martin & Brathwaite, 2012). Sin embargo, sí que hay registros de que diferentes insumos orgánicos pueden reducir el uso de fertilizantes, mejorar el rendimiento de las cosechas en general, incrementar el estrés a sequía o a anoxia por encharcamiento e incrementar el crecimiento de la planta y su fisiología (Richardson *et al.*, 2004). De acuerdo con Parađiković *et al.* (2011), la aplicación de bioestimulantes en planta de pimiento presentó un efecto positivo en la producción, incrementando además el contenido en pigmentos, vitamina C y compuestos fenólicos en los pimientos. Tzortzakís *et al.* (2012), demostraron en su trabajo que el uso de un compost proveniente de residuos urbanos incrementó entre un 10 y un 20% la altura de las plantas de pimiento, la producción y la biomasa en general del cultivo, sin embargo, también observaron que el peso fresco y el calibre de los pimientos disminuía a altas concentraciones del compost, hecho contrario a lo observado en este trabajo, donde los pimientos alcanzaron su mayor calibre y biomasa en peso fresco en el bancal IAS fertilizado con TCA. Por otra parte, Pascual *et al.* (2010) revelaron que el empleo de fangos activados previamente tratados incrementó la biomasa de cada uno de los órganos de la planta, así como de la producción de fruto. Sin embargo, sí que existen estudios sobre efecto en el crecimiento de planta de pimiento inoculando con PGPRs por separado, en lugar de ser aportados mediante una matriz líquida o sólida. Tariq *et al.* (2014) demostraron en su estudio que la inoculación conjunta de especies de los géneros *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* y *Bacillus* incrementó la producción y mejoró la salud del cultivo de pimiento; Kang *et al.* (2007) emplearon especies de *Pseudomonas* y *Pantoea* como inóculos, observando un incremento del tamaño de los pimientos y de su sistema radical de un 73,9% y 41,5% respectivamente; Datta *et al.* (2011) emplearon 15 especies obtenidas de la rizosfera como inoculantes, mejorando todas ellas el crecimiento y la producción, aunque especialmente *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp., que incrementaron además la biomasa de los pimientos producidos; Kanchana *et al.* (2014) emplearon cepas de *Azospirillum*, *Pseudo-*

monas, *Azotobacter* y *Bacillus*, registrando en las plantas un 99% de germinación, una mayor altura, una mayor biomasa en peso seco y una mayor producción de pimiento, que aumentó a su vez en biomasa. Por último, Lim & Kim (2013) publicaron que la inoculación con *B. licheniformis* aumentaba la resistencia al estrés por encharcamiento.

Mención aparte merece el caso de la planta forestal, debido a que en este campo prácticamente no hay información disponible sobre la aplicabilidad de los TCs. En un estudio llevado a cabo por Enebak (2005), las semillas de *Pinus taeda* L., *P. elliotii* Engelm. y *P. palustris* Mill. fueron inoculadas con diferentes cepas PGPRs en el momento de su siembra en el contenedor, sobre un sustrato de turba mezclada con fertilizante de liberación lenta. La inoculación con cepas de *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Serratia marcescens* y *Paenibacillus macerans*, seleccionadas por su probada capacidad de biocontrol en cultivos agronómicos incrementaron la velocidad de germinación de las semillas y algunas de ellas vieron reducida la mortalidad postemergencia. Sin embargo, a diferencia de lo observado tras aplicar TCA, a los tres meses de crecimiento no se observó una estimulación destacable del crecimiento de las plántulas. Probanza *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la inoculación con PGPRs pertenecientes al género *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 y *B. pumilus* CECT 5105) para mejorar el crecimiento de plantas de *Pinus pinea* L., observando los cambios que ocurrían en las comunidades microbianas de la rizosfera. Ambas cepas de *Bacillus* promovieron el crecimiento de las plántulas de *P. pinea*, pero este efecto biológico no se encontró en la aplicación conjunta de ambas cepas, lo que implicaría un posible efecto de competencia. Además, la introducción de ambos inóculos causó una alteración en la composición microbiana de la rizosfera, a pesar de los bajos niveles de inóculo que se encontraron al final del ensayo.

Tanto la altura, como el diámetro del cuello de la raíz y la biomasa son los rasgos más comunes analizados durante la evaluación de la calidad de las plántulas de la planta de pino, pero se ha descrito que estas dos medidas por sí solas, son inadecuadas para evaluar la condición de plántula completamente (Haase, 2008). Por ello, los índices morfológicos como el Índice de Robustez (IR) [*Sturdiness Quotient* (SQ)], la relación parte aérea-raíz (A:R) [*Shoot:root* (S:R)] o el Índice de Calidad de Dickson (ICD) son mucho más útiles. Unas plántulas de calidad crecidas en contenedor deben tener un cociente de robustez de alrededor de 6, una relación de parte aérea-raíz de 1:1 (Haase, 2007) y un valor

de ID entre 0,3 y 0,5 dependiendo del tipo de nutrición (Oliet, 1995). En las plantas con TCA el desarrollo radicular aumentó significativamente, lo que favoreció un desarrollo mucho más equilibrado, lo que se refleja tanto en la relación de parte aérea-raíz, como en el Índice de Dickson. Este índice permite evaluar las diferencias morfológicas entre plantas de una muestra y predecir el comportamiento en campo de las mismas, siendo el mejor parámetro para indicar la calidad de planta, ya que expresa el equilibrio de la distribución de la masa y la robustez. Seleccionar plantas más proporcionadas para el trasplante a campo incrementa su supervivencia, ya que estas últimas son menos susceptibles al estrés por sequía, viento y heladas y gracias a su entramado radicular, se asientan mejor en el sustrato.

A pesar de los rastreos bibliográficos realizados, no se ha encontrado información sobre la aplicación de TCAs en planta forestal, aunque sí hay algún trabajo en el que se describen incrementos en el crecimiento de los plantones tras la inoculación de bacterias PGPR, principalmente *Bacillus* y *Pseudomonas*, en *Pinus sylvestris* (Pokojska-Burdziej, 1982), *Pseudotsuga menziesii* (Khan *et al.*, 2015) o *Pinus pinea* (Probanza *et al.*, 2002), pero no se evalúan sus efectos a nivel fisiológico.

En la planta forestal, la morfología del sistema radicular es un factor clave para lograr un establecimiento exitoso de la planta después del trasplante a campo, como también lo es su estado fisiológico. Todos los parámetros fisiológicos evaluados indicaron un mejor estado de las plantas de pino cultivadas con TCA: presentaron el mayor contenido en clorofilas, así como en carotenoides, y un aumento significativo de la tasa fotosintética. Además, la relación Fv/Fm fue significativamente mayor que la de las plantas fertilizadas convencionalmente, lo que indicó un mejor estado del aparato fotosintético. Los efectos fisiológicos observados en este trabajo han sido descritos por otros autores en planta hortícola, donde, al usar compost o aplicar extractos foliares de compost enriquecido en microorganismos, se incrementa el contenido total de clorofila y la tasa fotosintética (Siddiqui *et al.*, 2009, Naidu *et al.*, 2013). El establecimiento exitoso de las plántulas depende en gran medida de su capacidad para generar rápidamente nuevas raíces (Grossnickle, 2005), debido a que su incremento puede mitigar los efectos del trasplante (Rietveld, 1989). Las plantas cultivadas con TCA han mostrado una mejor tasa fotosintética y han desarrollado un mayor crecimiento radicular, pero además, han mostrado mayor actividad enzimática tanto Fosfa-

tasa como Nitrato Reductasa, lo que posibilita una mejor toma de agua y nutrientes, y puede contribuir a una mayor tasa de supervivencia y a un aumento del crecimiento inicial tras el trasplante.

A diferencia de lo encontrado en los pinos, en la planta de pimiento los mayores valores de Fosfatasa y de Nitrato Reductasa se encontraron en las plantas crecidas con fertilización convencional. Estos resultados contrarios podrían ser debidos, en parte, al aporte de fósforo inorgánico de los microorganismos solubilizadores de la rizosfera acompañante (Rodríguez & Fraga, 1999), por lo que la planta no necesitaría inducir fuertemente la expresión de este enzima para conseguir fósforo inorgánico. En suelos con altas proporciones de fósforo orgánico, como es el caso de los suelos de bosques ácidos como los pinares, las fosfatasas juegan un papel fundamental en la adquisición de fósforo por parte de las raíces de las plantas (Haußling & Marschner, 1989), ya que a través de la acción de estos enzimas los compuestos orgánicos de fósforo se hidrolizan en formas inorgánicas biodisponibles. Además, las plantas de pino del vivero se encuentran micorrizadas de forma natural prácticamente en su totalidad, por lo que la detección de esa gran actividad enzimática puede ser debida a que se trata de la actividad conjunta de la ectomicorriza, es decir raíz de la planta y del hongo ectomicorrízico que la rodea (Lapeyrie *et al.*, 1991). En cuanto a la actividad Nitrato Reductasa, Margolis *et al.* (1988) descubrieron en ensayos con *Pinus banksiana* Lamb. que la actividad de este enzima era mayor en raíz que en acículas; mientras que Claussen & Lenz (1999) observaron que en géneros con frutos carnosos como *Vaccinium*, *Rubus*, y *Fragaria* la actividad Nitrato Reductasa y Glutamina Sintetasa era mayor en hoja que en raíz, hecho que se observa también en nuestro ensayo, salvo en el caso de la actividad Glutamina Sintetasa en plantas fertilizadas de forma convencional.

Especificidad y manejo

A la vista de los resultados obtenidos tanto en planta hortícola como en forestal, y en muy diferentes condiciones de cultivo, la idea mantenida por algunos autores de que, debido a que las PGPRs son frecuentemente aisladas de especies vegetales diferentes de aquellas en las que son inoculados, podría existir cierta especificidad que dificultara el desarrollo de inóculos efectivos para su aplicación en vivero o en campo (Enebak *et al.*, 1998), quedaría invalidada. Los resultados de este trabajo van en la línea de los de Khan *et al.* (2015), que demostraron que la inoculación con un consorcio de bacterias y levaduras endófitas extraídas de álamo y

sauce estimulaba tanto el crecimiento de plantas de cultivo y pastos como de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, por lo que concluyeron que los endófitos inoculados no son colonizadores específicos de la especie vegetal; por lo tanto indican que no parece haber problemas de especificidad a la hora de utilizar el TCA.

Por otra parte, aunque el TCA resulta beneficioso en comparación con el fertilizante convencional en un sustrato determinado, también es reseñable el efecto que el tipo de sustrato ha ejercido en todos los ensayos llevados a cabo. En el caso del cultivo de los pimientos en invernadero, por ejemplo, el tipo de sustrato que promovía un mayor crecimiento vegetal era la turba de *Sphagnum*, posiblemente debido a su elevado contenido en materia orgánica, factor que resulta muy importante para el desarrollo de la microbiota rizosférica acompañante y a que debido a su estructura poco densa, permite la infiltración de oxígeno y agua hacia la parte radical, previniendo fenómenos de anoxia. Sin embargo, ocurre un fenómeno llamativo en el ensayo de la turba esterilizada, donde se observa que aquellas plantas crecidas en sustrato autoclavado poseen una mayor altura, un mayor diámetro del tallo, un menor ángulo de inserción de los peciolo y un mayor contenido en pigmentos fotosintéticos. Este hecho podría ser debido a que una vez eliminados todos los microorganismos iniciales del sustrato, las plantas tomarían todos los nutrientes incorporados mediante la fertilización.

Cabe destacar el efecto del bancal enmendado con IAS en el ensayo en campo, especialmente aquel fertilizado con TCA, que proporciona un incremento en el área foliar total, en la longitud y diámetro del peciolo y en la biomasa general de la hoja, así como en su concentración de pigmentos fotosintéticos, dotando de una gran porte a las plantas de pimiento en campo. La enmienda IAS procede del material sólido del cual se realizó el té, por lo que contiene los nutrientes que no se han extraído durante la maceración, muy concentrados por haber perdido parte de la humedad y una gran cantidad de materia orgánica. Un compost maduro, tiene una relación C/N que oscila entre 10 (óptima), similar a la del humus, y 20 (Moreno, 2007), conteniendo, como en el caso de la turba de *Sphagnum* una cantidad razonable de materia orgánica. El hecho de añadir materia orgánica parcialmente degradada favorecería indirectamente el crecimiento de las plantas por activar el metabolismo microbiano, de forma similar a como ocurre con el bancal arcilloso, que posee un abonado inicial de fondo y de forma contraria al bancal arenoso, cuya enmienda está pensada no para aportar nutrientes, sino aireación al suelo.

El contenido de nutrientes de las plantas de pimiento cultivadas en bancal IAS destaca por la concentración de nitrógeno, magnesio, hierro y manganeso; esta mejora en la nutrición ha podido contribuir al incremento significativo, con respecto al fertilizante convencional, de la producción de pimiento. Además, también es de destacar que la utilización del IAS como enmienda orgánica haya influido en las características del fruto al observarse una reducción de la acidez del pimiento y un incremento de su contenido en sales y carbohidratos.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos señalar que la aplicación de enmiendas orgánicas, por ejemplo de compost, de manera previa al establecimiento de los cultivos, pueden incrementar los beneficios asociados a la utilización del TCA.

Cambios en la arquitectura vegetativa

La aplicación de TCA favorece el desarrollo radical: la raíz no solo es más grande, como se ve reflejado en los valores de biomasa, sino que se encuentra más ramificada y, además, la abundante ramificación se produce alrededor de la raíz de una forma homogénea y no principalmente en un plano, como se observaba en las raíces de las plantas producidas de forma convencional. Este mayor desarrollo radical incrementa la capacidad de absorción, además de proporcionar un mayor anclaje al sustrato.

Con respecto a la orientación de las hojas maduras, es de destacar la diferente inclinación de las hojas situadas a la altura media de la planta. Así, mientras que en las plantas crecidas con TCA la posición con respecto a la radiación es totalmente perpendicular, en las crecidas con fertilización convencional la posición es mucho más paralela, es decir, las hojas están inclinadas hacia abajo.

Cuando la lámina foliar se coloca de forma perpendicular a los rayos del sol (diaheliotropismo), su rol ecológico es el de maximizar la interceptación de la luz y la de mejorar la ganancia de carbono, indicando además que la hoja tiene capacidad fisiológica para utilizar altas irradiancias (Forseth & Ehleringer, 1983). Por el contrario, la tendencia a evitar directamente el haz solar (paraheliotropismo), es decir, la colocación de las hojas de forma que la lámina se mantenga paralela a los rayos directos del sol, se asocia con los esfuerzos de la planta para reducir los efectos negativos de determinado estrés como el estrés hídrico (Kao & Forseth, 1992), la fotoinhibición (Bawhey *et al.*, 2003), la ele-

vada temperatura foliar (Bielenberg *et al.*, 2003) o la baja disponibilidad de nitrógeno (Kao & Forseth, 1992), actuando sobre la transpiración y la conductancia (Isoda & Shah, 2006). En este sentido, cabe mencionar que se ha descrito que los cultivares de algodón con mayor capacidad de transpiración tienden a tener una mayor intercepción de luz por unidad de área foliar, orientación de la hoja que (Isoda & Wang, 2002) relacionan con una alta capacidad de transpiración respaldada por un sistema de raíz bien desarrollado; precisamente la estimulación del desarrollo radical, dotando a la planta de una mayor ramificación y, por lo tanto, de una mayor superficie de contacto con el suelo, es una de las características más destacables de la fertilización con TCA. Además, las hojas de pimiento crecidas con TCA presentan un mayor contenido en clorofilas y una mejor relación Fv/Fm, señal de un mejor estado del aparato fotosintético. En el caso de movimientos diaheliotrópicos, se ha postulado un incremento en la eficiencia de uso de agua, al incrementar la superficie de captura de radiación fotosintéticamente activa (PAR), y un aumento en las tasas fotosintéticas, lo que permite incrementar la ganancia de carbono por unidad de agua transpirada (Castellanos, 1989).

Sanidad

Además de todos los beneficios anteriormente mencionados y relacionados con el crecimiento y vigor de la planta, un interesante efecto indirecto ejercido por los PGPs, de gran repercusión agronómica, es el de ejercer un papel de agentes de biocontrol.

Actualmente, el empleo de pesticidas químicos para el control de enfermedades causadas por organismos fitopatógenos se encuentra cada vez más cuestionado debido a su efecto negativo sobre el medio ambiente y los seres humanos. Por ello, los distintos organismos internacionales tratan de impulsar una agricultura sostenible caracterizada por la sostenibilidad de la producción (Metas de Aichi. Objetivo estratégico A, meta 4). Además, entre las nuevas legislaciones, cabe destacar la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009 (DOUE n° 309, de 24 de noviembre de 2009), por la que se establece el marco de la actuación comunitaria con objeto de fomentar el desarrollo y la introducción de la gestión integrada de plagas y de técnicas alternativas que eviten la dependencia del uso de plaguicidas, reduzcan los residuos producidos y minimicen el impacto medioambiental. Este nuevo marco legislativo establece que los medios de lucha fitosanitaria deberán ser

preferentemente biológicos y físicos, lo que sin duda refuerza el papel de los bioestimulantes en la agricultura.

En general, la competencia por los nutrientes mediante la producción de sideróforos, la exclusión de nicho, la inducción de la resistencia sistémica y la producción de metabolitos antifúngicos -ácido cianhídrico entre los más descritos-, son los principales modos de mejorar la resistencia de las plantas a los organismos patógenos. Este tipo de estrategia es frecuente entre las especies del género *Pseudomonas*, como *P. putida* o *P. aeruginosa*, o *Serratia marcescens* (Pandey *et al.*, 2006, Selvakumar *et al.*, 2008, Ahemad & Khan, 2011, 2012). A menudo, el éxito de los TCAs está asociado a los beneficios aditivos como son el incremento en la disponibilidad de nutrientes en la proximidad de las raíces, así como a la presencia de agentes de biocontrol que incrementan el volumen del sistema radical y ayudan a la planta en la prevención y control de enfermedades (Haggag *et al.*, 2015).

En los pinos crecidos con TCA se observaron diferencias llamativas por el mayor contenido en potasio; la abundancia de este elemento es de vital importancia para su defensa, ya que existen evidencias de que las plantas con déficit de potasio permiten la entrada y desarrollo de patógenos como resultado de cambios físicos y metabólicos (Ammann *et al.*, 2008).

Con el ensayo de inoculación dirigida en pino, se observó que, transcurrida la mitad del periodo experimental, la longitud y el área del chancro de las plantas infectadas con *Fusarium* mostraban ya diferencias entre tratamientos, viéndose favorecidas en principio aquellas plantas fertilizadas con TCA, lo que se pudo corroborar al término del experimento, donde las diferencias entre tratamientos residieron no tanto en el número de plantas cuantificadas como muertas (22% vs. 17% con fertilización convencional y TCA, respectivamente), sino en el número de plantas que permanecieron asintomáticas (11% vs. 50%), por lo que, aunque la fertilización con TCA reduce ligeramente la proporción de plantas muertas, el número de plantas que se muestran asintomáticas es un valor a tener en cuenta a la hora de mantener un cultivo de *P. radiata* en vivo.

Los resultados publicados por Martin-Rodrigues *et al.* (2013) con estos mismos organismos constataron que pinos de 2 años crecidos bajo fertilización convencional mostraban los primeros síntomas de infección a los 7 días postinfección; sin embargo, en nuestro ensayo los

primeros síntomas fueron evidentes a los 42 dpi. Estas plantas de Martin-Rodrigues *et al.* (2013) tenían una altura promedio de 58,69 cm y un diámetro de 4,72 mm, mientras que en nuestro experimento, los valores de altura y diámetro eran de 76,87 cm y 8,24 mm, respectivamente. Teniendo en cuenta los resultados observados en las plantas sin fertilización y con fertilización convencional, así como los resultados obtenidos por Martin-Rodrigues *et al.* (2013), podría parecer que una mayor talla de la planta, y sobre todo, un mayor diámetro del tallo retrasase la aparición de los síntomas debido a la mayor distancia que el hongo tendría que recorrer hasta invadir la médula. No obstante, en el caso de los pinos con TCA se observa que no puede ser el único factor que explique este fenómeno, ya que cuentan con una altura y un diámetro menor que las plantas de fertilización convencional.

La defensa principal de las especies del género *Pinus* contra el ataque de fitopatógenos como *Fusarium circinatum* consiste en la secreción de resina y en la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (Phillips & Croteau, 1999, Morse *et al.*, 2004). La síntesis y secreción de resina tiene como finalidad sellar heridas y expulsar o atrapar organismos invasores, conteniendo además compuestos eficaces en la inhibición de fitopatógenos como monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos (Mumm & Hilker, 2006, Nagy *et al.*, 2006). El elevado aumento de la secreción de resina ha sido relacionado con el inicio de la Resistencia Sistémica Inducida y la activación de los conductos resiníferos traumáticos, provocando una producción de resina secundaria (Bonello *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006). En su trabajo, Martin-Rodrigues *et al.* (2013) demostraron que el número de canales resiníferos, tanto constitutivos, como traumáticos, aumentaban en número durante la infección, sin embargo, localizaron a *F. circinatum* metabólicamente activo alrededor de estos conductos, por lo que llegaron a la conclusión de que en lugar de paliar la progresión del patógeno, la secreción de los conductos resiníferos traumáticos le era beneficiosa, quizá debido a que no contenía una cantidad suficiente de compuestos orgánicos citotóxicos. Los resultados de nuestro experimento concuerdan con lo descrito por los mencionados autores, ya que, a pesar de observarse en las secciones de microscopía óptica una secreción masiva de resina, llegando incluso a taponar la fracción del xilema por donde se propagaba el patógeno con la intención de inmovilizarlo o inhibirlo, las imágenes al microscopio confocal revelaron que en esas mismas zonas el patógeno no sólo permanecía activo metabólicamente en el xilema o alrededor de los conductos resiníferos traumáticos,

sino que había conseguido llegar a la médula, desestructurándola. El área necrotizada es fácilmente reconocible, tanto en microscopía óptica como confocal, ya que en la primera se observa, además del evidente colapso por parte de la resina, una pérdida de la integridad del tejido xilemático y una desintegración tisular de la médula y en la segunda una disminución de la autofluorescencia del tejido necrotizado.

Por otra parte, fue llamativa la cantidad de hongo cuantificado en los pinos tras 98 dpis. La concentración de patógeno en los diferentes órganos de las plantas, tanto sintomáticas como no sintomáticas, fue significativamente inferior en las plantas fertilizadas con TCA, posiblemente debido en parte a una disminución del contenido de nitrógeno inorgánico, lo que restringiría el crecimiento y la esporulación del hongo (Paus-tian & Schnürer, 1987, Treseder & Allen, 2002, Ingham, 2005). Fue sorprendente encontrar al patógeno en las acículas que rodeaban la región donde se había producido el chancro resinoso, lo que estaría indicando que es capaz de propagarse hasta los haces vasculares de las mismas una vez ha colonizado el tallo, creando un nuevo vector de dispersión a considerar cuando el fitopatógeno es detectado en viveros y/o montes, aunque su concentración en acícula sea 100 veces inferior que en tallo.

En cuanto al contenido de ADN hongo-planta, los datos publicados por Martin-Rodrigues *et al.* (2013) estimaban un ratio de ADN hongo-planta entre 10^{-3} y 10^{-2} , cuatro órdenes inferior de lo constatado en el presente trabajo, aunque hay que señalar la existencia de diferencias entre ambos experimentos lo que puede repercutir en los resultados: 1) las semillas utilizadas en este trabajo proceden de huertos semilleros destinados a la mejora de la producción que fueron mantenidas en vivero a la intemperie hasta el traspaso a cámara de crecimiento, en contraposición con las semillas empleadas por Martin-Rodrigues *et al.* (2013) que se adquirieron de rodal semillero y que se mantuvieron constantemente en cámara de crecimiento, no necesitando de periodo de aclimatación; 2) los distintos regímenes de riego, dado que condiciones de riego no abundante provocan un retraso en la aparición e incidencia de los síntomas de la enfermedad (Sánchez-Zabala, 2013); 3) un fotoperiodo de 12 horas en comparación con un fotoperiodo de 16 horas, que favorecería un incremento en la fotosíntesis, pudiéndose destinar los fotoasimilados a otros aspectos diferentes al crecimiento, como la defensa y 4) la tasa de crecimiento de la cepa *F. circinatum* inoculada y la viabilidad de sus esporas, parámetros que se ven alterados cuanto más vieja es

la cepa y cuantas más resiembras ha sufrido a lo largo del tiempo en el medio de cultivo. Por eso es necesario tener en cuenta, para este y para futuros experimentos, que todas estas variables en la manipulación de los organismos pueden dar lugar a diferentes respuestas, aun siguiendo la misma metodología.

Aunque las variables anteriormente mencionadas pueden jugar un papel importante a la hora de controlar la virulencia de la infección por *F. circinatum*, el parámetro que se considera que más influyó en la supervivencia de *P. radiata* fue el tipo de nutrición aplicado. La mayor producción de Ácido salicílico (AS) y de Brasinosteroides (BR) tras la infección por el patógeno, se dio en plantas fertilizadas con TCA. De Torres Zabala *et al.* (2009) describieron el efecto antagonista que parece existir entre el ABA y el AS en favor del éxito de la infección de *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., en la que señalan que se requiere AS para desencadenar la respuesta inmune, sin embargo, la biosíntesis de ABA, suprime esta respuesta regulando negativamente la biosíntesis de AS, por lo que la diana de muchos efectores bacterianos es precisamente activar la biosíntesis del ABA. Tanto en el caso de las plantas regadas con agua, como con fertilizante convencional aparece un incremento de ABA en las plantas infectadas con respecto al control, si bien es cierto que en el primer tratamiento es de un 40% y en el segundo de un 2%; sin embargo, en las plantas de pino sí se corresponde un descenso de concentración de ABA con un aumento en la concentración de AS. Además, los mencionados autores puntualizaron que el Ácido Jasmónico (AJ) era poco probable que contribuyera en etapas tempranas de la infección y que de aparecer, sería a causa de una herida, como pasa en nuestro ensayo en el caso de las plantas regadas con agua tras 2 dpis, en el que se detecta AJ.

En los tratamientos de fertilización Convencional y TCA, tras 2 dpis de inoculación de *Fusarium*, descendió la concentración de las hormonas implicadas en el crecimiento y la elongación celular, posiblemente debido a una intensificación de recursos a la síntesis de AS; sin embargo, en el caso del TCA se observó un repunte en la concentración de BR, en especial al aumento de los Brasinólidos (BL) y sus precursores, las Castasteronas (CS). Se ha descubierto que los BL, que tradicionalmente han sido hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, poseen capacidad de inducir resistencia a la infección en plantas de tabaco y arroz frente a virus, bacterias y hongos (Nakashita *et al.*, 2003, Wang, 2012). Según estos autores, la resistencia mediada por los BL no requiere biosíntesis de salicílico, ni conduce

a la expresión de proteínas PR, por lo que no estaría relacionado con la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).

Existen estudios previos que también prueban que la fertilización de los cultivos con tés de compost, como es el caso del TCA, mejoran las defensas del hospedador incrementando la resistencia a la infección por fitopatógenos a través de la inducción de la síntesis de diversas enzimas de actividad oxidasa, como la peroxidasa (PO), la polifenol oxidasa (PPO) o implicadas en la síntesis de compuestos fenólicos, como la Fenilalanina Amonio liasa (PAL) (Chittoor *et al.*, 1990, Weltzien, 1991, Siddiqui *et al.*, 2009). En nuestro caso, tanto la Fenilalanina Amonio Liasa como la Chalcona Sintasa, enzimas implicadas en la síntesis de flavonoides, fenilpropanoides y fitoalexinas y de probada actividad antimicrobiana (Azcón-Bieto & Talón, 2008, Donoso *et al.*, 2015), se encuentran expresadas en mayor medida en aquellas plantas fertilizadas con TCA, de la misma manera que la proteína relacionada con la patogénesis (*PR protein*) Quitinasa, o el enzima HMG-COA2 implicada en la síntesis de isoprenoides. En especial los isoprenoides juegan un importante papel ya que muchos de ellos son de importancia fotosintética (al participar en la síntesis de carotenoides o xantofilas), fisiológica (los BR y las GA tienen una gran importancia en el comienzo de la fase S de la división celular) o de defensa (las esencias o resinas poseen actividad antimicrobiana) (Azcón-Bieto & Talón, 2008). La mayor expresión de estas enzimas con TCA tras la inoculación con el patógeno podría explicar las diferencias de concentración de *F. circinatum* encontradas con respecto a los otros dos tipos de fertilización, dado que un incremento de las defensas a tiempos cortos reduciría la cantidad de hongo que consiguiera adentrarse en el xilema a través del córtex.

Por otra parte, hay que tener también en cuenta que la introducción en el sistema suelo-planta, a través de los tés de compost, de poblaciones microbianas complejas de capacidad antagonista ejerce una acción supresora de organismos fitopatógenos (Domracheva *et al.*, 2010). En estos fertilizantes predominan especies bacterianas del género, *Bacillus*, *Pseudomonas*, bacterias ácido-lácticas, actinomicetos y hongos del género *Trichoderma*, entre otros (Welke, 2005, Siddiqui *et al.*, 2009, Naidu *et al.*, 2010), este último de demostrado efecto antagonista a lo largo de los años (Allona *et al.*, 1996, Cheah & Page, 1997, Veluthakkal & Dasgupta, 2010). Este efecto viene constatado en nuestro trabajo por el ensayo en el que se sembró a *F. circinatum* en placas con diferentes concentraciones de TCA, donde se observó que con únicamente una concentración del

25% se ejercía una inhibición significativa en el crecimiento, en la viabilidad de las esporas y se inducía una gran producción de esporas, estrategia de huida ante una situación de estrés, bien por competencia por los nutrientes o el espacio, o por la síntesis de compuestos antibióticos ya vistos como el ácido cianhídrico, el peróxido de hidrógeno y compuestos antifúngicos. Por ello, el empleo de estos té de compost como fertilizantes sería conveniente también en el caso de infección por vía radical de *F. circinatum*, ya que este hongo es capaz de sobrevivir en la turba de *Sphagnum* e infectar por esa vía a *P. radiata* como demostraron Martín-Rodriguez *et al.* (2015).

Se encuentra probado, además, que los microorganismos presentes en los té de compost son capaces de estimular la resistencia inducida de la planta, inhibir a los microorganismos patógenos mediante mecanismos de antibiosis, parasitismo y competencia por los recursos, mecanismo que sería dependiente de la concentración de estos microorganismos en el té, debiendo superar el umbral de 10^7 UFCs·mL⁻¹, y mediante la presencia de ciertos compuestos orgánicos como los compuestos húmicos (Scheuerell & Mahaffee, 2004). Estos mecanismos han demostrado ser efectivos contra una gran variedad de patógenos (Kai *et al.*, 1990, Weltzien, 1991, Scheuerell & Mahaffee, 2002, Siddiqui *et al.*, 2009, Palmer *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2015) y llegando incluso a inducir *in vitro* la lisis en las esporas de *Fusarium*, lo que estaría relacionado con la supresión de la enfermedad (Ma *et al.*, 2001). En su revisión, Scheuerell & Mahaffee (2002) destacan la importancia de la aplicación previa a la infección de una forma preventiva y que la frecuencia de fertilización dependería principalmente de las tasas de reproducción del patógeno en concreto, de sus métodos de propagación y de las condiciones ambientales.

El té de compost además de poder aplicarse sobre el suelo, aumentando el volumen radical de la planta, incrementando la biomasa del suelo y mejorando los ciclos de nutrientes, es posible usarlos como spray foliar sin diluir intentando cubrir un mínimo del 60-70% de la superficie. Al ser extraídos los microorganismos del compost de hojas y tallo, el nicho natural de la mayoría de estas bacterias y hongos es la filosfera vegetal y al retornar de nuevo a su ambiente óptimo son capaces de sobrevivir en la parte aérea de las plantas y de aprovechar los nutrientes que ésta les proporciona, volviéndose grandes competidores contra los patógenos *air-borne* (Ingham, 2005). Esta forma de aplicación sería interesante en futuros trabajos para prevenir la entrada de *F. circinatum* por vía aérea.

8.3. EFECTO EN SUELO

CE, pH y Redox

Por el efecto del propio metabolismo biológico, la adición de cualquier tipo de fertilizante afecta a las propiedades físico-químicas de la rizosfera de las plántulas, en especial la conductividad eléctrica (CE), el potencial de oxido-reducción, el pH, y la disponibilidad de nutrientes (Jacobs & Timmer, 2005) y, en consecuencia, a corto plazo, al crecimiento y funcionamiento del sistema radical y, a largo plazo, a su supervivencia y desarrollo en campo.

Con respecto a la conductividad eléctrica del sustrato, las diferentes condiciones de cultivo mostraron diferentes valores: los pimientos cultivados en bancales y las plántulas de pino crecidas en invernadero mostraron valores cercanos a $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, o lo que es lo mismo, $0,1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, lo que según (Castellanos, 2000) se considera un suelo libre de sales e idóneo para cualquier cultivo por no superar los $2 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$. Otros autores consideran que una CE por debajo de $3,5 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ es aceptable para el crecimiento general del cultivo (Naidu *et al.*, 2010), por lo que los sustratos de los pimientos cultivados en invernadero, aun llegando a presentar una conductividad de $0,7 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, se considerarían aptos para un desarrollo adecuado de las plantas.

Los valores de pH de todos los sustratos de los experimentos oscilaron entre 7 y 8, en algún caso en el límite de lo que se considerarían condiciones óptimas para el crecimiento vegetal. La turba, el suelo y el insumo agrícola sólido usados en los experimentos de laboratorio tenían valores de pH de 7,0, 7,4 y 7,9 respectivamente y el pH de los bancales abarcó desde 6,5 del bancal arenoso a 7,6 del bancal con IAS. En el caso del pino, aunque (Theodorou & Bowen, 1969) en un estudio desarrollado en plantas de *P. radiata* postularon que las plantas que crecían durante 5 meses a un pH de 8 experimentaban una disminución de crecimiento en torno al 60-80%, en nuestro caso no observamos dicho efecto negativo. Los valores biométricos obtenidos no solo estaban por encima del rango mínimo recomendado para planta de reforestación, incluso en el caso de las plantas que solo recibieron agua, sino que a los 10 meses las plantas crecidas en convencional están por encima del valor recomendado (30 cm) para el momento de salida de la planta a campo. Esto se vio favorecido por el hecho de que tanto el otoño como el invierno fueron excepcionalmente cálidos, con abundantes días solea-

dos, por lo que las plantas mantuvieron su crecimiento durante toda la fase de vivero, sin entrar en parada vegetativa.

En el caso del potencial redox del sustrato, los mayores valores se dieron en los cultivos de pimiento en turba sin fertilizar en invernadero, con un valor de +260 mV y en el cultivo de plántulas de pino en turba en invernadero, con un valor de +239 mV, aunque los valores en los cultivos de pimiento en bancal fueron sensiblemente inferiores, con un valor promedio de +132 mV. En base al estudio de DeLaune & Reddy (2005) y según las aproximaciones realizadas en la revisión de Husson (2013), el potencial de oxido-reducción obtenido en todos los experimentos indicaría un suelo con estado redox moderadamente reducido y un metabolismo microbiano anaerobio facultativo, con predominancia de la mayoría de los nutrientes en sus formas reducidas, como es el caso del nitrógeno en forma de amonio, lo que beneficiaría a las plántulas de pino al ser un sustrato de toma preferente en su caso (McFee & Stone, 1968, Pérez-Soba & Van der Eerden, 1993, Warren & Adams, 2002).

Sirviéndose de los diagramas de Pourbaix, Husson (2013) determinó que el rango de crecimiento favorable de las plantas se situaba en un pH entre 5,5 y 8 y que probablemente el rango de potencial de oxido-reducción óptimo para el crecimiento de las mismas se situase entre +400 y +450 mV en base al equilibrio $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ que permitiera el mayor crecimiento vegetal (Marschner, 1995) y a la biodisponibilidad de la mayoría de macro y micronutrientes. A pesar de que nuestros resultados no encajan con el óptimo descrito por Husson, en ningún caso se observó un efecto negativo en el crecimiento de las plantas, ni una variación significativa en las condiciones físico-químicas del suelo.

Actividad microbiana

El estudio del perfil metabólico reveló que las poblaciones microbianas de aquellos sustratos fertilizados presentaban una mayor velocidad de aclimatación al nuevo medio que aquellos sustratos que no lo estaban, ya que dispondrían de nutrientes de reserva para superar la fase *lag* en menos tiempo; así como un consumo más amplio y rápido de sustratos de las microplacas. En general, en la mayoría de los suelos, los carbohidratos y los ácidos carboxílicos eran los sustratos inicialmente consumidos por las poblaciones microbianas, ya que se trata de unos compuestos de carbono de fácil asimilación para obtener energía rápidamente. Es excepcional la rápida metabolización de los polímeros en

el caso de los suelos de los bancales, lo que estaría indicando que en estos suelos se encontrarían, de forma más abundante que en otros sustratos, especies microbianas capaces de degradar compuestos recalcitrantes y, por lo tanto, apreciadas en el campo de la biomineralización y la biorremediación (Kirk & Farrell, 1987, Lonvaud-Funel, 2001, Kawai, 2010).

En general, aquellos suelos fertilizados con TCA presentaron valores elevados del índice NUSE, lo que, según Sala *et al.* (2006) sugiere una elevada actividad aminopeptidasa de sus poblaciones microbianas al provenir de sustratos con baja concentración de amonio o nitrato. Esto estaría indicando que el nitrógeno se encontraba de forma limitante en el cultivo fertilizado con TCA, aspecto que concuerda con el 0,15% de nitrógeno total que contiene sin diluir. A pesar de la baja concentración de nitrógeno añadido en forma de fertilizante, las poblaciones microbianas de los sustratos con TCA fueron capaces de proliferar de igual manera que las poblaciones de sustratos fertilizados de forma convencional gracias a la batería enzimática para hidrolizar las macromoléculas contenidas en el sustrato.

Existen diversos estudios que han observado cambios estructurales en las poblaciones microbianas sin que se produjeran los correspondientes cambios funcionales, lo que de nuevo sugiere la existencia de una redundancia funcional de los microorganismos del suelo (Marschner *et al.*, 2003), mecanismo que explica la resiliencia y resistencia de los ecosistemas. Sin embargo, es necesario recalcar que el estudio de las comunidades mediante el uso de las EcoMicroplates sólo da información sobre la función de la comunidad microbiana para un rango muy estrecho de condiciones y tiene el inconveniente de seleccionar las especies adaptadas al crecimiento rápido en sustratos simples en altas concentraciones (Smalla *et al.*, 1998). Además, el hecho de que los hongos no sean capaces de utilizar el colorante tetrazolio incorporado en los pocillos para el desarrollo del color (Preston-Mafham *et al.*, 2002) hace que estas placas sólo permitan observar la evolución de las poblaciones bacterianas, pero no de la comunidad en su conjunto.

A diferencia de las EcoMicroplates, que se basan en la determinación de las actividades enzimáticas de aquellas especies que se han adaptado al rápido crecimiento en sustratos simples, la medición de la actividad enzimática del suelo sí representa en cierta medida el funcionamiento de toda la comunidad microbiana. Las actividades β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa juegan un papel clave en la descomposición de la materia orgánica.

nica y en la mineralización de los nutrientes C, N y P en el suelo. La β -glucosaminidasa participa en la degradación de la quitina, que es convertida en aminoazúcares, una fuente importante de carbono y nitrógeno fácilmente mineralizable en suelos húmedos (Ekenler & Tabatabai, 2002). La actividad fosfatasa es una enzima de gran valor agronómico ya que hidroliza compuestos de fósforo orgánico y los transforma en diferentes formas de fósforo inorgánico, que son asimilables por las plantas (Amador *et al.*, 1997). La ureasa, por medio de la transformación del nitrógeno orgánico en amoníaco, están involucrada en la mineralización del nitrógeno (Acosta-Martínez *et al.*, 2007).

La cuantificación directa de la actividad de los enzimas microbianos mostró que, en general, fueron las fosfatasas los enzimas que registraron las mayores actividades. Sería esperable que la fertilización mediante TCA indujera una mayor actividad enzimática de los enzimas ureasa y fosfatasa, ya que este insumo se caracteriza por su baja concentración de nitrógeno libre aportado y la ausencia de fósforo; esto es precisamente lo que se observó en las poblaciones microbianas de la turba en la que crecieron plántulas de pino. Sin embargo, en las mediciones de actividad enzimática de los distintos sustratos donde se cultivó pimiento no existieron diferencias entre el tratamiento convencional y TCA para estos dos enzimas. Esto podría deberse al método en transecto por el cual fueron obtenidas las muestras de suelo: en el caso de los contenedores de pino, la raíz ocupó la totalidad del volumen, por lo que el suelo obtenido fue completamente rizosférico, no así el suelo de los contenedores o de los bancales donde fueron cultivados los pimientos, en los que se realizaron tomas de muestra a lo largo y en profundidad, minimizando la contribución de las comunidades rizosféricas donde se encontrarían principalmente estos microorganismos. Por lo tanto, es probable que las actividades más representativas de lo que ocurre en la rizosfera sean aquellas obtenidas de los microorganismos de la turba donde creció *P. radiata*, ya que existen previos estudios realizados por Pant *et al.* (2011) que apoyan la hipótesis de que la aplicación de tés de compost, en su caso de vermicompost, incrementa en un 50% la actividad enzimática microbiana y, en consecuencia, el contenido de N y K en la rizosfera del Pack Choi. Por otra parte, Scharenbroch *et al.* (2011) también describen un incremento de la actividad microbiana del suelo al aplicar TCAs y compararlo con un suelo tratado solo con agua, aunque el incremento fue inferior al de los suelos tratados con fertilizante convencional. A la vista de la variabilidad en los resultados obtenidos, y de los pocos estudios en los que apoyarse para valorar el

efecto de los TCs en la actividad microbiana, antes de poder llegar a conclusiones fiables, es necesario realizar más ensayos en los que se pueda determinar la actividad enzimática rizosférica, así como la del “bulk soil” y compararlas.

Diversidad microbiana

El análisis de la diversidad específica mediante técnicas moleculares (DGGE) reveló que en sustrato suelo la proporción de especies bacterianas y fúngicas se mantenía más o menos constante en los diferentes tipos de fertilización, indicando una fuerte capacidad de resiliencia de sus poblaciones microbianas tras la aplicación de un fertilizante, con independencia de la naturaleza de éste. No ocurrió así en turba, donde las proporciones de los diferentes taxones variaron en función del tipo de fertilización y donde incluso apareció un nuevo taxón (especies pertenecientes al dominio Arquea).

Este método de análisis presenta diversas ventajas e inconvenientes: como ventajas destacar que se trata de una técnica muy sensible y reproducible, que permite realizar estudios preliminares de las comunidades de numerosas muestras a la vez en vistas a realizar análisis más detallados y detecta la presencia de microorganismos no cultivables; aunque presenta dificultades para separar fragmentos que difieran en unas pocas bases (Vallaey *et al.*, 1997); al ser una técnica basada en la extracción de ADN, puede que los métodos de extracción de ácidos nucleicos no aseguren la lisis y posterior obtención del material genético de todos los microorganismos presentes y no permite detectar microorganismos que constituyan menos del 1% de la comunidad, dado que los geles de DGGE presentan una limitación en el número de bandas que pueden separarse (Muyzer *et al.*, 1993). Esta última desventaja podría ser la explicación de la ausencia de arqueas en sustrato suelo, ya que todas las muestras de suelo fueron extraídas con el mismo kit: las poblaciones de arqueas en suelo se encontrarían en una proporción inferior al 1% y por lo tanto no se detectan tras la electroforesis.

Al analizar la diversidad microbiana en base a los microorganismos cultivables, considerando todos los sustratos y condiciones de cultivo en conjunto, fue el bancal arcilloso el que destacó por presentar grandes densidades bacterianas, posiblemente debido a la presencia de unas condiciones propicias para su crecimiento: materia orgánica y sales provenientes del sustrato base (suelo de pastos) y partículas de arena que generasen nichos propicios para el crecimiento

bacteriano aumentando la porosidad del sustrato, la entrada de oxígeno y la percolación del agua, evitando encharcamientos. La elevada densidad bacteriana encontrada también en el sustrato IAS podría tener la misma explicación, ya que es semejante en textura al contener trazas de material vegetal más o menos triturado, que mezclado con el suelo base permite una menor compactación de éste y una mejor aireación. El hecho de que contenga material vegetal parcialmente descompuesto también explicaría la abundancia fúngica en este sustrato, dado que se trata de una fuente de materia y energía para estos organismos descomponedores. El género *Pseudomonas*, por su parte, también mostró una abundante densidad en el suelo arcilloso. Varias especies de este género están descritas como copiótrofas (van Bruggen & Semenov, 2000) y agresivas colonizadoras de la superficie radical de las plantas (Schelkle & Peterson, 1997), lo que explicaría que se vieran favorecidas en un sustrato con abono orgánico de fondo, que además ha sostenido una importante producción vegetal. Finalmente, de entre los tres tipos de nutrición, se cuantificó una mayor densidad microbiana bajo fertilización con TCA, lo que indica que el aporte de microorganismos influía en la composición microbiana del suelo.

Entre las bacterias aisladas en cultivo puro, aparecen especies predominantes típicas de procesos de compostaje, muchas de ellas consideradas como PGPBs, que bien podrían haberse incorporado al suelo tras la adición del TCA o verse estimuladas tras la adición de éste, dando lugar a un enriquecimiento de las poblaciones. Estas especies serían: *Pseudomonas alcaligenes*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *Lactobacillus sakei*, o *Citrobacter freundii* (Droffner *et al.*, 1995, Ashraf *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2009, Naidu *et al.*, 2010, Bashan *et al.*, 2014), especie no detectada en el recuento en medio LB, pero sí en análisis posteriores en medio NBF (Nitrogen Free Bromothymol Blue), medio selectivo para fijadores de nitrógeno. Además fueron detectadas especies típicas de la rizosfera, como *Pseudomonas fluorescens* (Marschner & Crowley, 1996); endófitas, como *Pseudomonas putida* o *Serratia marcescens* (Ryan *et al.*, 2008) o actinomicetos como *Gordonia terrae* (Naidu *et al.*, 2010). Entre los hongos, las especies predominantes coinciden con los géneros más comunes en este tipo de extractos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Naidu *et al.*, 2010).

Al analizar toda la comunidad en su conjunto, se pudieron distinguir cuatro grandes grupos de tratamientos

en base a sus poblaciones microbianas si se establecía una similaridad del 50%. Dentro de esos cuatro grupos, se observa que aquellos sustratos regados con agua presentan una clara tendencia a separarse de los demás sustratos, posiblemente por el hecho de que el aporte de fertilización desplaza a las especies oligotróficas en favor de las copiótrofas (Fierer *et al.*, 2011, Carbonetto *et al.*, 2014), alterando las especies de la comunidad de forma tanto cuantitativa, como cualitativa. Es especialmente llamativo el caso de la turba fertilizada con TCA, que se diferencia del gran grupo de los suelos fertilizados, debido al aumento, en particular, de las especies *B. marisflavi*, *P. aeruginosa* y *B. spectabilis* con respecto al resto de sustratos fertilizados, sin embargo, el análisis de coordenadas principales muestra que solamente un 47,7% de la variabilidad se encuentra explicada por factores físico-químicos del suelo, como su composición o el tipo de fertilización aplicada. El restante 52,3% podría deberse a: 1) el tipo de cultivo que albergó cada sustrato, ya que la turba es el único sustrato de este análisis en el que no creció planta de pimiento y en el análisis de clasificación se observa que este sustrato no presenta tendencia a agruparse con los demás; 2) los factores climatológicos del año en el que se llevaron a cabo los cultivos, al tener en cuenta que los pinos crecieron bajo túnel abierto y los bancales quedaban completamente expuestos a la climatología y 3) el tipo de manejo previo de los bancales antes del inicio del experimento.

Durante los últimos años se han comenzado a realizar análisis del metagenoma de suelos destinados a la agricultura para observar los cambios que se producen en función del manejo, llegando a la conclusión de que efectivamente existen diferencias entre las comunidades de suelos con manejo convencional y los que no habían experimentado ningún tipo de manipulación (Fierer *et al.*, 2011, Carbonetto *et al.*, 2014), sin embargo, estos análisis estudian los cambios en la comunidad principalmente a nivel de filo, impidiendo observar la dinámica de las especies, por lo que se podría decir que no son particularmente adecuados, si es una especie concreta la que posee un interés agronómico en particular.

En nuestro trabajo hemos podido comprobar, pese a analizar únicamente los microorganismos cultivables, que la adición de fertilizante convencional, como de TCA hace que varíe la proporción de cada una de las especies con respecto a la población total en comparación con el tratamiento control; promoviendo, concretamente el TCA, un aumento de la proporción de

bacterias del género *Pseudomonas* en los sustratos de los bancales y de los hongos en el caso de la turba. Sin embargo, su aplicación no altera prácticamente la diversidad específica total con respecto al riego con agua, ya que los valores del Índice de Shannon son por lo general altos y similares entre sí. Es el tratamiento con fertilización convencional el que tiende a presentar menores índices de diversidad en función del sustrato. Al margen de la mayor o menor diversidad presente en cada uno de los sustratos, el Índice de Simpson muestra que en todos ellos hay, claramente, una especie dominante sobre las demás, por sus valores tan cercanos a 1.

En cuanto a las bacterias, el género más abundante es el género *Lactobacillus*, perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas y dentro del filum Firmicutes, filo con especies saprobias y otras comensales y dominantes en el tracto digestivo de los seres humanos, primates y otros mamíferos (Vaughan *et al.*, 2005). *L. sakei* y *L. plantarum* destacan por su abundancia en prácticamente todos los sustratos, salvo en el sustrato arenoso regado con agua y la turba fertilizada con TCA. *Lactobacillus sakei*, es una bacteria muy empleada en la industria alimentaria por la producción de sustancias biocidas: ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Chaillou *et al.*, 2005), péptidos propios de bacterias ácido lácticas para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. La secreción de estos compuestos, especialmente especies reactivas de oxígeno (ROS) y antibióticos podría ser la razón por la que consigue predominar sobre el resto de morfotipos con los que cohabita y lo que le podría convertir en un microorganismo interesante para el biocontrol de plagas. Por otra parte, existen diversos estudios que prueban que *L. plantarum* es capaz de sintetizar compuestos antifúngicos (Lavermicocca *et al.*, 2000, Ström *et al.*, 2002) y que podría ser un eficaz probiótico (Nguyen *et al.*, 2007).

Serratia marcescens es una especie diazotrofa (fijadora de nitrógeno), razón por la cual es la bacteria más abundante (33%) en un medio tan escaso en nutrientes como es el bancal arenoso sin fertilizar, aunque está presente en la mayoría de los sustratos en menor proporción. Algunas de sus cepas son endófitas (Gyaneshwar *et al.*, 2001) y ha sido descrita como un microorganismo promotor del crecimiento vegetal al producir IAAs (Khalid *et al.*, 2004, Lavania *et al.*, 2006), estimulador del sistema inmune de la planta, en concreto de resistencia sistémica inducida (RSI) (Kloepper *et al.*, 1993), productor de sustancias antagonistas contra patógenos (de Queiroz & de Melo, 2006) y solubilizador de fosfatos

(Tripura *et al.*, 2007), lo que convierte a *S. marcescens* en una importante especie promotora del crecimiento vegetal y agente de biocontrol.

Gordonia terrae, otra de las especies más frecuentemente encontradas, es una bacteria perteneciente a la clase Actinobacteria, que posee la capacidad de oxidar grupos reducidos de azufre asociados a hidrocarburos (Elkin *et al.*, 2013). Junto con *G. amicalis*, *G. terrae* es un microorganismo abundante en suelos gravemente contaminados por aceites (Shen *et al.*, 2008), siendo incluso capaz de degradar alcanos de cadena larga tras adicionar hidrocarburos que emplea como única fuente de carbono y energía (Hernandez-Perez *et al.*, 2001, Kubota *et al.*, 2008), lo que convertiría a esta especie en un eficaz biorremediador de suelos, característica que comparte con algunos otros miembros de la misma clase debido a su batería enzimática oxidativa.

Dentro del género *Bacillus*, se encuentran presentes de forma general, *Bacillus subtilis* y *B. pumilus*. *B. subtilis* es una especie típica del suelo, ubicua, capaz de adaptarse a múltiples ambientes y, como todas las especies del género, es capaz de formar endosporas propagables a través del viento ante limitación de nutrientes o algún tipo de estrés (Earl *et al.*, 2008). Tradicionalmente se le ha considerado como un organismo aerobio obligado, sin embargo, se ha podido encontrar en el tracto digestivo de diversos vertebrados en forma no esporulada, siendo incluso aislada de vegetales durante el proceso de encurtido (Inatsu *et al.*, 2006, Earl *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado *in vitro* que forma biofilms en las raíces de *Arabidopsis thaliana*, estimula la RSI de las plantas, hace biodisponibles moléculas de fósforo y nitrógeno (Nagórska *et al.*, 2007) y secreta más de dos docenas de antibióticos con una gran variedad de estructuras que previenen de infecciones por patógenos (Stein, 2005). *Bacillus pumilus* es otra PGPR también de gran interés; el equipo de Gutiérrez-Mañero *et al.* (2001) llegó a la conclusión de que producían grandes concentraciones de Giberelinas, que estimularían el crecimiento del tallo y las raíces de plantas de aliso. Al igual que *B. subtilis*, *B. pumilus* es capaz de producir compuestos antifúngicos eficaces fundamentalmente contra especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, aunque no tanto sobre *Botrytis* (Leifert *et al.*, 1995, Munimbazi, 1998), celulasas (Ariffin *et al.*, 2006), o incluso de degradar pesticidas clorados empleándolos como fuente única de carbono y energía o co-metabolizándolo en presencia de glucosa (Anwar *et al.*, 2009), lo que convierte a esta especie en otro importante agente de biocontrol y biorremediador de sustratos contaminados.

Pseudomonas putida, la especie del género *Pseudomonas* hallada en la mayoría de los sustratos, es una bacteria productora de ácido indolacético. Este ácido secretado por bacterias puede promover el crecimiento radical estimulando directamente la elongación celular en las plantas, la división celular o bien indirectamente, mediante la actividad desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Patten & Glick, 2002). Es de resaltar la abundancia de *Pseudomonas chlororaphis* en sustrato IAS y en turba bajo fertilización con TCA, donde también destaca la abundancia de *P. aeruginosa*. *P. chlororaphis* es una bacteria no patógena productora de un amplio espectro de compuestos antifúngicos como moléculas hidrofóbicas, cianuro de hidrógeno, quitinasas y proteasas (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998), por lo que podría ser un fuerte candidato como organismo de control de fitopatógenos fúngicos, además, como hemos podido comprobar haciéndola crecer sobre medios específicos, tiene una elevada capacidad de solubilización de fosfatos y de K. El aporte del TCA parece tener un efecto sinérgico y estimular su desarrollo, lo que, dado sus capacidades solubilizadoras, indudablemente favorecerá la disponibilidad de nutrientes para la planta. Por su parte, la importancia de *P. aeruginosa* reside en su capacidad para producir potentes sustancias antimicrobianas, utilizada industrialmente desde el siglo XIX (Botzenhart & Döring, 1993), cuyo reservorio se localiza principalmente en suelos destinados a la agricultura (Green *et al.*, 1974).

Aunque quizá de entre todas las especies mencionadas, es la PGPR más conocida, *Pseudomonas fluorescens*, en este trabajo se ha conseguido aislar solo de forma puntual y principalmente en turba sin fertilizar. Esta especie ha sido estudiada desde los años 70 como potenciadora del crecimiento y agente de control de plagas. Su característica más relevante es sin duda la producción de pigmento fluorescente, soluble en agua y que es capaz de secretar al medio (fenómeno que también se ha observado en este trabajo con las especies *P. putida* y *P. guariconensis*). Varios autores han especulado sobre la utilidad de este compuesto, que podría ser un quelante de hierro sintetizado al detectar situaciones en las que este elemento se encuentra limitante y/o no biodisponible y evitando a su vez que pueda ser empleado por microorganismos patógenos para su crecimiento (Meyer & Abdallah, 1978, Schelkle & Peterson, 1997). No solo inhibiría el crecimiento de otros organismos mediante el secuestro de hierro, sino que la secreción de pioluteorina puede ser un eficaz agente antibiótico contra patógenos de plantas, como

ha sido demostrado para *Phytium ultimum* Trow. (Howell & Stipanovic, 1980). Además posee la capacidad de formar biofilms (O'Toole & Kolter, 1998) y de degradar hidrocarburos mediante la secreción de biosurfactantes, de forma semejante al método de degradación de *P. alcaligenes* (Barathi & Vasudevan, 2001).

De forma opuesta a como sucedió en el caso de las bacterias, donde los microorganismos más abundantes resultaron ser microorganismos promotores del crecimiento vegetal; en el caso de los hongos, las especies más frecuentemente aisladas fueron agentes relacionados con la descomposición orgánica, como *Fusarium oxysporum*, *Byssochlamys spectabilis*, *Aspergillus niger* o agentes típicamente vinculados al suelo como las especies del género *Trichoderma* o *Penicillium*.

De entre las especies fúngicas más frecuentemente aisladas de los extractos de suelo encontramos a *Fusarium oxysporum*, siendo también frecuente *F. equiseti* que, aunque como ocurre con *F. oxysporum*, existen cepas patógenas (Lazreg *et al.*, 2013), se caracteriza por ser un endófito típico de las raíces de las plantas con potencial como agente de control contra patógenos de raíz y nemátodos (Maciá-Vicente *et al.*, 2008a, Maciá-Vicente *et al.*, 2008b).

Las especies de *Fusarium* son ubicuas y pueden ser saprobitas o atacar a plantas y animales. De entre todas las especies, probablemente sea *F. oxysporum* la que más daños causa a los tejidos vasculares de multitud de cultivos. Pueden esporular dentro del hospedador, formando microconidias (predominantemente) y macroconidias para dispersar al hongo tanto a través de la planta como fuera de ella mediante el agua o el viento y clamidosporas, como estructuras de resistencia en los tejidos ya muertos de la planta a la que se encontraba parasitando (Nelson, 1981). Es de destacar que, uno de los efectos más destacados, a nivel de microbiota, de la aplicación de TCA es la reducción significativa de la presencia de *F. oxysporum* en los suelos. Ello puede deberse al enriquecimiento de los mismos con especies como las mencionadas anteriormente, con capacidad productora de compuestos antifúngicos. Además, también se aportan esporas de *Trichoderma*, un género tradicionalmente usado como agente de biocontrol de las cepas patógenas (Dubey *et al.*, 2007), en especial las especies *T. viride* (John *et al.*, 2010), *T. harzianum* (Srivastava *et al.*, 2010) o *T. virens*; estas dos últimas han sido probadas como agente de biocontrol de plagas fúngicas, tanto en vivero como en

campo, debido a su actividad quitinolítica de sus enzimas N-acetil-B-D-Glucosaminidasa y 1,4-B-Quitobiosidasa (Lorito *et al.*, 1993). Estos hongos, clasificados como beneficiosos para las plantas por ser promotores de su crecimiento, incrementan la biomasa vegetal y estimulan el desarrollo de raíces laterales a través de la producción de compuestos semejantes a las auxinas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) y favorecen la producción del cultivo al ser capaces de solubilizar fosfatos, óxidos de hierro, manganeso y zinc del medio mediante procesos como quelación y/o reducción (Elad *et al.*, 1980, Altomare *et al.*, 1999, Yedidia *et al.*, 2001). Tendersoo *et al.* (2009) concluyeron que los hongos generalistas, entre los que se encontraría el género *Trichoderma*, podrían verse favorecidos frente a otras especies al cultivarse en medio sólido, debido a su rápido crecimiento micelial y a su ecología no específica, enmascarando la presencia de otras especies de menor tasa de crecimiento o con requerimientos específicos. Puede que su presencia en los medios de cultivo haya impedido el desarrollo de otras especies, que necesitan más tiempo para adaptarse y colonizar el medio en condiciones *in vitro*.

Otra de las especies de mayor frecuencia de aparición fue *Byssochlamys spectabilis*, especie emparentada con los géneros *Paecilomyces* y *Talaromyces* (Watanabe *et al.*, 2008) es un ascomicota típico de suelo, capaz de sobrevivir en condiciones de microaerofilia y cuyas ascosporas son capaces de sobrevivir a temperaturas de 85°C y tiene actividad pectinolítica (Houbraken *et al.*, 2006). La pectina o Ácido Poligalacturónico es una macromolécula que se encuentra en las paredes celulares de las plantas, por lo que se trataría de un hongo saprobio que contribuye a la mineralización de la materia orgánica.

De entre los representantes del género *Penicillium*, las especies más abundantes en orden decreciente fueron: *P. sanguifluum*, hongo mesófilo detectado en suelos de baja conductividad que genera un alto volumen de exudados anaranjados *in vitro* (Visagie *et al.*, 2014, Samadi *et al.*, 2016); *P. murcianum*, aislada por Ramírez & Martínez (1981) en suelos arenosos (en este estudio ha aparecido en los cuatro sustratos, aunque fundamentalmente en el sustrato IAS) y clasificada como microorganismo endófito de las raíces de *Chenopodium quinoa* Willd. por González-Teuber *et al.* (2017); *P. concentricum*, clasificado también como endófito de *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel (Angelini *et al.*, 2012) y *P. chrysogenum*, que además de ser la especie mayoritariamente usada en la industria para producir penicilina (van den Berg *et al.*, 2008) y tanasas

(Rajakumar & Nandy, 1983), destaca por ser capaz de bioacumular metales (Fourest *et al.*, 1994).

Por último, de entre las especies del género *Aspergillus*, las especies aisladas en orden de frecuencia decreciente fueron: *A. cervinus*, microorganismo rizosférico productor de precursores del ácido penicílico (He *et al.*, 2004); *A. niger*, productor de toxinas (Abarca *et al.*, 1994), celulasas y hemicelulasas (Kang *et al.*, 2004) y capaz de bioadsorber pigmentos tipo azo o metales pesados (Kapoor *et al.*, 1999, Fu & Viraraghavan, 2002); *A. fumigatus*, al que es posible encontrar en trozos de madera ubicados en pilas durante la producción de compost (Millner *et al.*, 1977), en el sustrato de plantas ornamentales (Nolard *et al.*, 1988) y se cree que su ubicuidad en la naturaleza es posible debido a su estilo de vida saprofítico sobre materia orgánica en descomposición (Tekaia & Latgé, 2005) y *A. terreus*, que es un buen biorremediador de compuestos fenólicos (García *et al.*, 1997) y productor de ácido itacónico (Okabe *et al.*, 2009). Todos estos géneros (*Byssochlamys*, *Penicillium* y *Aspergillus*), al ser saprobios, estarían detrás de las actividades β -glucosaminidasa, Arilsulfatasa y Ureasa registradas, contribuyendo al reciclaje de los nutrientes del suelo y, consecuentemente, a la nutrición vegetal.

8.4. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo es un primer paso para profundizar en el efecto de la aplicación del té de compost aireado en el sistema planta-suelo-microbiota, que permite observar, de forma detallada, el comportamiento de cada uno de sus componentes por separado y compararlo con la ausencia de fertilización y la aplicación de fertilizante convencional.

Como queda demostrado, su uso es apto para el crecimiento de planta de uso extensivo (girasol), de uso intensivo (pimiento) y de uso forestal (pino). No obstante, es necesario puntualizar que estos ensayos han sido llevados a cabo principalmente en laboratorio y en pequeñas parcelas de uso experimental, siendo necesario un posterior salto cuantitativo que consista en la aplicación del producto a gran escala, durante al menos tres periodos de siembra y recolección, en los diferentes suelos destinados a la agricultura con sus particularidades concretas y bajo diferentes regímenes climatológicos. Esta suma de variables permitirá ampliar el conocimiento sobre la aplicación de este TCA en concreto, proporcionando valiosa información para elaborar protocolos de manejo según el caso. De hecho,

el concepto *terroir* en el ámbito de la viticultura, no es sino una forma de expresar que la calidad de un producto, en este caso el vino, depende principalmente de la conjunción de las propiedades edafobióticas del suelo, microclima y la gestión del cultivo.

En la actualidad, se ha iniciado su aplicación en grandes parcelas con cultivos destinados al consumo humano, como sorgo y olivo. Aún se encuentran en el primer año de aplicación, por lo que será necesario esperar para disponer de unos resultados consistentes.



Conclusiones



CONCLUSIONES

- 1 Los bioensayos de germinación muestran que el TCA evaluado, rico en microorganismos promotores del crecimiento (PGPs), es un producto no fitotóxico con efecto fitoestimulante.
- 2 El TCA presenta baja especificidad, pudiendo ser aplicado a diferentes especies vegetales, sustratos y condiciones de cultivo, a pesar de su baja concentración en nitrógeno (0,15%) y potasio (0,46%), ya que su eficacia reside en la acción de los PGPs.
- 3 La aplicación del TCA posibilita la obtención de una planta equilibrada y vigorosa, con una estimulación del sistema radical, lo que contribuye a mejorar la absorción de agua y nutrientes; además optimiza el estado fisiológico de la planta, dotándola de un elevado contenido en pigmentos y una mayor superficie foliar, lo que conlleva una mejora de la capacidad fotosintética y favorece el crecimiento vegetativo y la producción.
- 4 Además de un aumento de la superficie de absorción radical, en la estimulación del crecimiento de la planta también juegan un papel importante el incremento de la disponibilidad de nutrientes por medio de la fijación biológica de N y de la mineralización de P y K promovidas por la microbiota del TCA. En este sentido destacan especialmente las especies de los géneros *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas* y *Serratia*.
- 5 En función del tipo de fertilización durante la fase de vivero de *P. radiata*, se observa diferente patrón hormonal, así como una diferente expresión de los genes implicados en la respuesta de la planta a la infección por patógenos. Tras la inoculación de *F. circinatum*, los pinos fertilizados con TCA presentaron una mayor síntesis de Ácido Salicílico y una mayor inducción de los genes codificantes de la Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) y la Chalcona Sintasa (CHS), enzimas de la ruta de síntesis de los flavonoides. Asimismo, estas plantas presentaron menor concentración de patógeno en los tejidos, menor deterioro anatómico, menor severidad de los síntomas y una menor mortandad. Por lo tanto, la aplicación de TCA contribuye a reducir la susceptibilidad al patógeno.
- 6 La aplicación de TCA no altera significativamente las condiciones físico-químicas del suelo; sin embargo, para un manejo continuo y adecuado del cultivo sería conveniente mantener un aporte regular de materia orgánica que evite su agotamiento.
- 7 En base al análisis de los microorganismos cultivables se ha constatado que la aplicación de TCA no afecta negativamente a las características edafobiológicas, a diferencia de la fertilización convencional que muestra un descenso en la diversidad al favorecer unas especies en detrimento de otras. Es de destacar, que el aporte del TCA, manteniendo la diversidad, estimula la abundancia de algunas especies como *Pseudomonas chlororaphis* y *P. aeruginosa*, ambas con una elevada capacidad de solubilización de P y de K, así como su gran potencial como agentes de biocontrol.
- 8 El empleo de TCAs puede ser una estrategia de producción amigable y sostenible que permite revalorizar el residuo verde y convertirlo en una eficaz herramienta de biofertilización.



Bibliografía

10



- Abad M, Noguera P & Burés S (2001) National inventory of organic wastes for use as growing media for ornamental potted plant production: case study in Spain. *Bioresource Technology* **77**: 197-200.
- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G & Cabañes FJ (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2650-2652.
- Acosta-Martínez V, Cruz L, Sotomayor-Ramírez D & Pérez-Alegria L (2007) Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology* **35**: 35-45.
- Addiscott TM (1995) Entropy and sustainability. *European Journal of Soil Science* **46**: 161-168.
- Adesemoye AO & Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1-12.
- Adesemoye AO, Torbert HA & Kloepper JW (2009) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology* **58**: 921-929.
- Aegerter BJ & Gordon TR (2006) Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management* **235**: 14-17.
- Aguilar-García L, Escalante-Estrada JA, Fucikovsky-Zak L, Tijerina-Chávez L & Mark Engleman E (2005) Área foliar, tasa de asimilación neta, rendimiento y densidad de población en girasol. *Terra Latinoamericana* **23**: 303-310.
- Aguilera E, Lassaletta L, Sanz-Cobena A, Garnier J & Vallejo A (2013) The potential of organic fertilizers and water management to reduce N₂O emissions in Mediterranean climate cropping systems. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **164**: 32-52.
- Aguirrezábal LAN, Orioli GA, Hernández LF, V.R. P & Miravé JP (2001) Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. (Balcarce IEEA, ed.) Offset Vega, Buenos Aires. Argentina.
- Ahemad M & Khan MS (2011) Toxicological assessment of selective pesticides towards plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **58**: 169-187.
- Ahemad M & Khan MS (2012) Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* **86**: 945-950.
- Akiyama H, McTaggart IP, Ball BC & Scott A (2004) N₂O, NO, and NH₃ emissions from soil after the application of organic fertilizers, urea and water. *Water, air and soil pollution* **156**: 113-129.
- Allona I, Collada C, Casado R, Paz-Ares J & Aragoncillo C (1996) Bacterial expression of an active class Ib chitinase from *Castanea sativa* cotyledons. *Plant Molecular Biology* **32**: 1171-1176.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M & Ullrich CI (2006) Role of Cytokinin and Auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* **97**: 883-893.
- Altier N, Beyhaut E, Dalla Rizza M & Rivas M (2012) Plataforma de bioinsumos de uso agrícola en base a microorganismos benéficos. *Revista INIA* **29**: 47-50.
- Altomare C, Norvell WA, Björkman T & Harman GE (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2926-2933.
- Amador JA, Glucksman AM, Lyons JB & Görres JH (1997) Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. *Soil Science* **162**: 808-825.
- Amir HG, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Marziah M & Ramlan MF (2005) Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **36**: 2059-2066.
- Amtmann A, Troufflard S & Armengaud P (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* **133**: 682-691.
- Anastasi A, Varese GC & Filipello Marchisio V (2005) Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia* **97**: 33-44.
- Andrews JH & Harris RF (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 145-180.
- Angelini P, Rubini A, Gigante D, Reale L, Pagiotti R & Venanzoni R (2012) The endophytic fungal communities associated with the leaves and roots of the common reed (*Phragmites australis*) in Lake Trasimeno (Perugia, Italy) in declining and healthy stands. *Fungal Ecology* **5**: 683-693.

- Ansorena J, Batalla E, Merino D & Moreno A (2012) El compost de biorresiduos como componente de sustratos.
- Anwar S, Liaquat F, Khan QM, Khalid ZM & Iqbal S (2009) Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials* **168**: 400-405.
- Ariffin H, Abdullah N, Umi Kalsom MS, Shirai Y & Hassan MA (2006) Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology* **3**: 47-53.
- Arthur GD, Stirk WA, van Staden J & Scott P (2003) Effect of a seaweed concentrate on the growth and yield of three varieties of *Capsicum annum*. *South African Journal of Botany* **69**: 207-211.
- Aseri GK, Jain N, Panwar J, Rao AV & Meghwal PR (2008) Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae* **117**: 130-135.
- Ashelford KE, Day MJ & Fry JC (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and environmental microbiology* **69**: 285-289.
- Ashraf R, Shahid F & Ali TA (2007) Association of fungi, bacteria and actinomycetes with different composts. *Pakistan Journal of Botany* **39**: 2141-2151.
- Azcón-Bieto J & Talón M (2008) *Fundamentos de Fisiología vegetal*. McGraw-Hill. Madrid.
- Azcón-Bieto J, Pardo A, Gómez-Casanovas N, Irigoyen JJ & Sánchez-Díaz M (2004) Respuestas de la fotosíntesis y la respiración en un medio ambiente variable. *La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*, (Reigosa M, Pedrol, N., Sánchez, A., ed.) pp. 873-899. Thomson Paraninfo. Madrid, España.
- Aznar-Sánchez JA, Galdeano-Gómez E & Pérez-Mesa JC (2011) Intensive horticulture in Almería (Spain): A counterpoint to current european rural policy strategies. *Journal of Agrarian Change* **11**: 241-261.
- Bailey LD & Beauchamp EG (1971) Nitrate reduction and redox potentials measured with permanently and temporarily placed platinum electrodes in saturated soils. *Canadian Journal of Soil Science* **51**: 51-58.
- Bakker JC (1989) The effects of air humidity on flowering, fruit set, seed set and fruit growth of glasshouse sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae* **40**: 1-8.
- Barathi S & Vasudevan N (2001) Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* **26**: 413-416.
- Barry KM, Davies NW & Mohammed CL (2001) Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **12**: 120-127.
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR & Hernandez J-P (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil* **378**: 1-33.
- Bawhey C, Grant RH & Gao W (2003) Digital measurement of heliotropic leaf response in soybean cultivars and leaf exposure to solar UVB radiation. *Agricultural and Forest Meteorology* **120**: 161-175.
- Beare MH, Coleman DC, Crossley DA, Hendrix PF & Odum EP (1995) A Hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity: Proceedings of the International Symposium on Soil Biodiversity, held at Michigan State University, East Lansing, May 3-6, 1993*, (Collins HP, Robertson GP & Klug MJ, eds.), pp. 5-22. Springer, Netherlands.
- Beattie GA (2006) Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *Plant-associated bacteria*, (Gnanamanickam S, ed.) pp. 1-56. Springer, Netherlands.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P & Kausarud H (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* **10**: 189-197.
- Bengtsson J, Ahnström J & Weibull AC (2005) The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* **42**: 261-269.
- Benttez E, Melgar R, Sainz H, Gómez M & Nogales R (2000) Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annum*, L.) grown with olive cake mulches. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1829-1835.
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology* **84**: 11-18.
- Bielenberg DG, Miller JD & Berg VS (2003) Paraheliotropism in two *Phaseolus* species: combined effects

- of photon flux density and pulvinus temperature, and consequences for leaf gas exchange. *Environmental and Experimental Botany* **49**: 95-105.
- Birkhofer K, Bezemer TM, Bloem J, *et al.* (2008) Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2297-2308.
- Biswas DR & Basak BB (2015) Potassium solubilising microorganisms. Their mechanisms, potentialities and challenges as potassium biofertilizer. *Indian Journal of Fertilisers* **9**: 102-116.
- Blodgett JT, Herms DA & Bonello P (2005) Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* **208**: 373-382.
- Boava LP, Laia ML, Jacob TR, Dabbas KM, Gonçalves JF, Ferro JA, Ferro MI & Furtado EL (2010) Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. *BMC Research Notes* **3**: 43-51.
- Bollag JM, Shuttleworth KL & Anderson DH (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied and environmental microbiology* **54**: 3086-3091.
- Bolton H, Elliott LF, Papendick RI & Bezdicsek DF (1985) Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: Effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biology and Biochemistry* **17**: 297-302.
- Bonello P & Blodgett JT (2003) *Pinus nigra-Sphaeropsis sapinea* as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 249-261.
- Bonello P, Gordon TR, Herms DA, Wood DL & Erbilgin N (2006) Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: A novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 95-104.
- Bonello P, Storer AJ, Gordon TR, Wood DL & Heller W (2003) Systemic effects of *Heterobasidion annosum* on ferulic acid glucoside and lignin of presymptomatic ponderosa pine phloem, and potential effects on bark-beetle-associated fungi. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 1167-1182.
- Bonello P, Gordon TR & Storer AJ (2001) Systemic induced resistance in Monterey pine. *Forest Pathology* **31**: 99-106.
- Borin JBM, Carmona FDC, Anghinoni I, Martins AP, Jaeger IR, Marcolin E, Hernandez GC & Camargo ES (2016) Soil solution chemical attributes, rice response and water use efficiency under different flood irrigation management methods. *Agricultural Water Management* **176**: 9-17.
- Botzenhart K & Döring G (1993) Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen Infectious Agents and Pathogenesis*, (Campa M, Friedman H, ed.) Springer, Boston, MA.
- Britz H, Couhnho TA, Gordon TR & Wingfield MJ (2001) Characterisation of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. *South African Journal of Botany* **67**: 609-614.
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD & Noller HF (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**: 107-127.
- Burda S & Oleszek W (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 2774-2779.
- Burdett AN (1990) Physiological processes in plantation establishment and the development of specifications for forest planting stock. *Canadian Journal of Forest Research* **20**: 415-427.
- Butland SL, Chow ML & Ellis BE (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Molecular Biology* **37**: 15-24.
- Calvo P, Nelson L & Kloepper JW (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* **383**: 3-41.
- Camarena-Gutiérrez G & de la Torre-Almaráz R (2007) Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado Actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* **13**: 157-162.
- Canbolat MY, Bilen S, Çakmakçı R, Şahin F & Aydın A (2006) Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils* **42**: 350-357.
- Canellas LP & Olivares F (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoters. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **1**: 3-13.
- Canfield DE, Glazer AN & Falkowski PG (2010) The evolution and future of Earth's Nitrogen cycle. *Science* **330**: 192-196.
- Carballo T, Gil MV, Calvo LF & Morán A (2009) The influence of aeration system, temperature and compost

- origin on the phytotoxicity of Compost Tea. *Compost Science & Utilization* 17: 127-139.
- Carbonetto B, Rascovan N, Álvarez R, Mentaberry A & Vázquez MP (2014) Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine pampas. *Plos One* 9: e99949.
- Carey WA, Oak SW & Enebak SA (2005) Pitch canker ratings of longleaf pine clones correlate with *Fusarium circinatum* infestation of seeds and seedling mortality in containers. *Forest Pathology* 35: 205-212.
- Carvalho FP (2006) Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy* 9: 685-692.
- Castellanos EA (1989) Fotosíntesis y economía del carbono en plantas superiores. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 49: 41-60.
- Castellanos RJZ (2000) *Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas*. Intagri, México.
- Chaillou S, Champomier-Vergès MC, Cornet M, et al. (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23: 1527-1533.
- Chan OC, Liu WT & Fang HH (2001) Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water Science & Technology* 43: 77-82.
- Chang S, Puryear J & Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Cheah LH & Page BBC (1997) *Trichoderma* spp. for potential biocontrol of clubroot of vegetable brassicas. *Crop & Food Research* 150-153.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA & Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Cheng Z, Park E & Glick BR (2007) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 912-918.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, van der Bij AJ, et al. (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1069-1077.
- Chittoor JM, Leach JE & White FF (1990) Induction of peroxidase during defense against pathogens. *Pathogenesis: Related Proteins in Plants*, (Datta SK, Muthukrishnan, S, ed.) p. 291. CRC Press, Florida.
- Choi KH & Dobbs FC (1999) Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 36: 203-213.
- Claussen W & Lenz F (1999) Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil* 208: 95-102.
- COAG (2009) http://www.fao.org/unfao/bodies/coag/coag21/index_es.htm. Última consulta, mayo 2018.
- Conforti F, Statti GA & Menichini F (2007) Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry* 102: 1096-1104.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C & López-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an Auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149: 1579-1592.
- Correll JC, Gordon TR, McCain AH, Fox JW, Koehler CS, Wood DL & Schultz ME (1991) Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pines (*Pinus radiata*). *Plant Disease Journal* 75: 676-682.
- Daood HG, Vinkler M, Markus F, Hebshi EA & Biacs PA (1996) Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chemistry* 55: 365-372.
- Datta M, Palit R, Sengupta C, Pandit MK & Banerjee S (2011) Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of Chilli (*Capsicum annum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science* 5: 531-536.
- Davis JM, Wu H, Cooke JEK, Reed JM, Luce KS & Michler CH (2002) Pathogen challenge, Salicylic Acid, and Jasmonic Acid regulate expression of Chitinase gene homologs in pine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 380-387.
- Dawson JC, Huggins DR & Jones SS (2008) Characterizing nitrogen use efficiency in natural and agricultural ecosystems to improve the performance of cereal crops in low-input and organic agricultural systems. *Field Crops Research* 107: 89-101.
- De Keyser E, Desmet L, Van Bockstaele E & De Riek J (2013) How to perform RT-qPCR accurately in plant species? A case study on flower colour gene expression

- in an azalea (*Rhododendron simsii* hybrids) mapping population. *BMC Molecular Biology* **14**: 13-27.
- De Pascale S, Ruggiero C, Barbieri G & Maggio A (2003) Physiological responses of pepper to salinity and drought. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 48-54.
- De Queiroz BPV & de Melo IS (2006) Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**: 448-450.
- De Torres Zabala M, Bennett MH, Truman WH & Grant MR (2009) Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal* **59**: 375-386.
- DeLaune R & Reddy K (2005) Redox potential. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, (Hillel D, ed.) pp. 366-371. Academic Press, United Kingdom.
- Deng SP & Tabatabai MA (1994) Cellulase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1347-1354.
- Di HJ & Cameron KC (2002) Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **46**: 237-256.
- Dick WA, Cheng L & Wang P (2000) Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1915-1919.
- Dickson A, Leaf AL & Hosner JF (1960) Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *The Forestry Chronicle* **36**: 10-13.
- Domracheva LI, Shirokikh IG & Fokina AI (2010) Anti-*Fusarium* activity of cyanobacteria and actinomycetes in soil and rhizosphere. *Microbiology* **79**: 871-876.
- Dong JZ & Dunstan DI (1997) Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* **201**: 189-194.
- Donoso A, Rodriguez V, Carrasco A, Ahumada R, Sanfuentes E & Valenzuela S (2015) Relative expression of seven candidate genes for pathogen resistance on *Pinus radiata* infected with *Fusarium circinatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **92**: 42-50.
- Droffner ML, Brinton WF & Evans E (1995) Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50-70°C) composting environments. *Biomass and Bioenergy* **8**: 191-195.
- Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* **196**: 3-14.
- Dubey SC, Suresh M & Singh B (2007) Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control* **40**: 118-127.
- Duffy B, Sarreal C, Ravva S & Stanker L (2004) Effect of molasses on regrowth of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in Compost Teas. *Compost Science & Utilization* **12**: 93-96.
- Earl AM, Losick R & Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **16**: 269-275.
- Ekenler M & Tabatabai M (2002) β -Glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biology and Fertility of Soils* **36**: 367-376.
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I & Daayf F (2010) Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* **8**: 968-987.
- Elad Y & Shtienberg D (1994) Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Protection* **13**: 109-114.
- Elad Y, Chet I & Katan J (1980) *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**: 119-121.
- Elkin AA, Kylosova TI, Grishko VV & Ivshina IB (2013) Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides by *Gordonia terrae* IEGM 136 and *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **89**: 82-85.
- Emino ER & Warman PR (2004) Biological Assay for Compost Quality. *Compost Science & Utilization* **12**: 342-348.
- Enebak SA (2005) Rhizobacteria isolated from loblolly pine seedlings mediate growth-promotion of greenhouse-grown loblolly, slash, and longleaf pine seedlings. *Forest Science* **51**: 541-545.
- Enebak SA, Wei G & Kloepper JW (1998) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Journal of Forest Science* **44**: 139-144.
- Eng F, Gutiérrez-Rojas M & Favela-Torres E (2003) Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae*. *Revista Iberoamericana de Micología* **20**: 172-175.
- Epelde L, Becerril JM, Barrutia O, González-Oreja JA & Garbisu C (2010) Interactions between plant and

- rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environmental Pollution* **158**: 1576-1583.
- Epelde L, Becerril JM, Mijangos I & Garbisu C (2009) Evaluation of the efficiency of a phytostabilization process with biological indicators of soil health. *Journal of Environmental Quality* **38**: 2041-2049.
- Epelde L, Hernández-Allica J, Becerril JM, Blanco F & Garbisu C (2008) Effects of chelates on plants and soil microbial community: Comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Science of the Total Environment* **401**: 21-28.
- Erisman JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z & Winiwarter W (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* **1**: 636-639.
- Escalante-Estrada JA (1999) Área foliar, senescencia y rendimiento del girasol de humedad residual en función del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* **17**: 149-157.
- Etesami H, Emami S & Alikhani HA (2015) Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant-growth, and future prospects- a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **17**: 897-911.
- Eustat (1996) Superficie forestal arbolada de la C.A. de Euskadi por ámbitos territoriales. Gobierno Vasco http://www.eustat.eus/elementos/ele0000400/Superficie_forestal_arbolada_de_la_CA_de_Euskadi_por_ambitos_territoriales/tbl0000451_c.html#axzz4Vpp2WCfz. Última consulta mayo 2018.
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA & Knight R (2011) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal* **6**: 1007-1017.
- Finck A (1988) *Fertilizantes y fertilización: fundamentos y métodos para la fertilización de los cultivos*. Reverte, Barcelona.
- Flagella Z, Rotunno T, Tarantino E, Di Caterina R & De Caro A (2002) Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *European Journal of Agronomy* **17**: 221-230.
- Fließbach A & Mäder P (2000) Microbial biomass and size-density fractions differ between soils of organic and conventional agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 757-768.
- Forseth IN & Ehleringer JR (1983) Ecophysiology of two solar tracking desert winter annuals. IV. Effects of leaf orientation on calculated daily carbon and water use efficiency. *Oecologia* **58**: 10-18.
- Fossdal CG, Nagy N, Ari H, Yakovlev I & Solheim H (2011) The reaction zone is a unique plant defense found in trees: differentially expressed genes and cell wall changes. *BMC Proceedings* **5**: P84.
- Foster SSD, Cripps AC & Smith-Carington A (1982) Nitrate leaching to groundwater. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **296**: 477-489.
- Fourest E, Canal C & Roux JC (1994) Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. *FEMS Microbiology Reviews* **14**: 325-332.
- Fraedrich SW & Miller T (1995) Mycoflora associated with slash-pine seeds from cones collected at seed orchards and cone-processing facilities in the southeastern USA. *European Journal of Forest Pathology* **25**: 73-82.
- Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E & Krekling T (2005) Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* **167**: 353-376.
- Fu Y & Viraraghavan T (2002) Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Advances in Environmental Research* **7**: 239-247.
- Gamalero E, Trotta A, Massa N, Copetta A, Martinotti MG & Berta G (2004) Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* **14**: 185-192.
- Ganesan V (2008) Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. *Current Microbiology* **56**: 403-407.
- Ganeshamurthy AN & Takkar PN (1997) Residual management of sulfur applied to soybean or wheat in a soybean-wheat system on Vertisols. *Australian Journal of Soil Research* **35**: 199-208.
- García C, Hernández T, Costa C, Ceccanti B, Masciandaro G & Ciardi C (1993) A study of biochemical parameters of composted and fresh municipal wastes. *Biore-source Technology* **44**: 17-23.
- García IG, Venceslada JLB, Peña PRJ & Gómez ER (1997) Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Water Research* **31**: 2005-2011.
- Gardes M & Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113-118.

- Gharib FA, Moussa LA & Massoud ON (2008) Effect of compost and bio-fertilizers on growth, Yield and essential oil of sweet marjoram (*Majorana hortensis*) plant. *International Journal of Agriculture and Biology* **10**: 381-387.
- Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leirós MC & Seoane S (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 877-887.
- Glick BR, Liu C, Ghosh S & Dumbroff EB (1997) Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1233-1239.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J & McConkey B (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 227-242.
- Golterman HL (1995) The labyrinth of nutrient cycles and buffers in wetlands: results based on research in the Camargue (southern France). *Hydrobiologia* **315**: 39-58.
- Gómez-Arnau J (1988) El cultivo del girasol. (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). Centro de Investigación Agrícola, Sevilla.
- Gómez-Guiñan Y (2004) Actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizosfera de *Arachys hypogea* (Papilionaceae). *Revista de Biología Tropical* **52**: 287-295.
- Gomiero T, Pimentel D & Paoletti MG (2011) Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**: 95-124.
- González G (2005) Resultados preliminares del estudio *Fusarium circinatum*: conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su control. Concepción, Chile.
- González-Teuber M, Vilo C & Bascuñán-Godoy L (2017) Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genomics Data* **11**: 109-112.
- Gordon TR (2006) Pitch canker disease of pines. *Phytopathology* **96**: 657-659.
- Gordon TR, Kirkpatrick SC, Aegerter BJ, Fisher AJ, Storer AJ & Wood DL (2011) Evidence for the occurrence of induced resistance to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*), in populations of *Pinus radiata*. *Forest Pathology* **41**: 227-232.
- Goulding K (2000) Nitrate leaching from arable and horticultural land. *Soil use and management* **16**: 145-151.
- Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SD & Vitanza-Jack VB (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology* **28**: 987-991.
- Greenwood DJ (1990) Production or productivity: the nitrate problem? *Annals of Applied Biology* **117**: 209-231.
- Grossnickle SC (2005) Importance of root growth in overcoming planting stress. *New Forests* **30**: 273-294.
- Gryndler M, Hršelová H, Klír J, Kubát J & Votruba J (2003) Long-term fertilization affects the abundance of saprotrophic microfungi degrading resistant forms of soil organic matter. *Folia Microbiologica* **48**: 76-82.
- Gryndler M, Larsen J, Hršelová H, Řezáčová V, Gryndlerová H & Kubát J (2006) Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* **16**: 159-166.
- Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouachi J, Tadeo FR & Talón M (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* **111**: 206-211.
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B & Ladha JK (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **183**: 2634-2645.
- Gyaneshwar P, Naresh Kumar G, Parekh LJ & Poole PS (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* **245**: 83-93.
- Haase DL (2007) Morphological and physiological evaluations of seedling quality, (Proceedings RMRS-P-50). pp. 3-8. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, United States.
- Haase DL (2008) Understanding forest seedling quality: measurements and interpretation. *Tree Planters' Notes* **52**: 24-30.
- Haggag WM, Abouzienna HF, Hoballah E, Saber M & Singer S (2015) The use of microbial inoculantes in clean farming systems, present situation and future prospective. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **7**: 1029-1041.

- Hall JA, Peirson D, Ghosh S & Glick R. B (1996) Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium gr12-2. *Israel Journal of Plant Sciences* **44**: 37-42.
- Hamayun M, Afzal Khan S, Ahmad N, *et al.* (2009) *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 627-632.
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP & Reddy G (2008) Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* **163**: 234-242.
- Hargreaves JC, Adl MS & Warman PR (2009) Are compost teas an effective nutrient amendment in the cultivation of strawberries? Soil and plant tissue effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**: 390-397.
- Hattendorf MJ, Redelfs MS, Amos B, Stone LR & Gwin RE (1988) Comparative water use characteristics of six row crops. *Agronomy Journal* **80**: 80-85.
- Hättenschwiler S & Vitousek PM (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 238-243.
- Häußling M & Marschner H (1989) Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphatase activity in the rhizosphere of 80-year-old Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees. *Biological Fertility of Soils* **8**: 128-133.
- Hawkins BJ, Davradou M, Pier D & Shortt R (1995) Frost hardiness and winter photosynthesis of *Thuja plicata* and *Pseudotsuga menzies* seedlings grown at three rates of nitrogen and phosphorus supply. *Canadian Journal of Forest Research* **25**: 18-28.
- He J, Wijeratne EMK, Bashyal BP, Zhan J, Seliga CJ, Liu MX, Pierson EE, Pierson LS, VanEtten HD & Gunatilaka AAL (2004) Cytotoxic and other metabolites of *Aspergillus* inhabiting the rhizosphere of Sonoran desert plants. *Journal of Natural Products* **67**: 1985-1991.
- Heal OW & Dighton J (1986) Nutrient cycling and decomposition in natural terrestrial ecosystems. *Microfloral and faunal interactions in natural and agro-ecosystems*, (Mitchell MJ & Nakas JP, eds.), pp. 14-73. Springer, Netherlands.
- Hecnar SJ (1995) Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environmental toxicology and chemistry* **14**: 2131-2137.
- Hernandez-Perez G, Fayolle F & Vandecasteele J-P (2001) Biodegradation of ethyl t-butyl ether (ETBE), methyl t-butyl ether (MTBE) and t-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 117-121.
- Hildebrandt A, Guillamón M, Lacorte S, Tauler R & Barceló D (2008) Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research* **42**: 3315-3326.
- Hossain MM, Sultana F & Islam S (2017) Plant growth-promoting fungi (PGPF): phytostimulation and induced systemic resistance. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives Vol 2: Microbial Interactions and Agro-ecological Impacts*, (Singh DP, Sing HB, Prabha R, ed.) pp. 135-191. Springer Nature, Singapur.
- Houbraken J, Samson RA & Frisvad JC (2006) *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. *Advances in Food Mycology*, (Hocking AD, Pitt JI, Samson RA & Thrane U, eds.), pp. 211-224. Springer US, Boston, MA.
- Howell CR & Stipanovic RD (1980) Suppression of *Phytophthora ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**: 712-715.
- Hulisz P, Piernik A, Mantilla-Contreras J & Elvisto T (2016) Main driving factors for seacoast vegetation in the southern and eastern Baltic. *Wetlands* **36**: 909-919.
- Husson O (2013) Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant and Soil* **362**: 389-417.
- Hutcheson SW (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 59-90.
- Idris EE, Bochow H, Ross H & Borriss R (2004) Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection* **111**: 583-597.
- Igual J, Valverde A, Cervantes E & Velázquez E (2001) Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie* **21**: 561-568.
- Inatsu Y, Nakamura N, Yuriko Y, Fushimi T, Watanasiritum L & Kawamoto S (2006) Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented

- soybean food in northern Thailand. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 237-242.
- Ingham ER (2005) The Compost Tea Brewing Manual (5th). Soil Food International Inc.
- Ioos R, Fourrier C, Iancu G & Gordon TR (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a Real-Time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* **99**: 582-590.
- Iqbal S, Hameed S, Sharid M, Hussain K, Ahmad K & Niaz M (2018) In vitro characterization of bacterial endophytes from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for phyto-beneficial traits. *Applied Ecology and Environmental Research* **16**: 1037-1051.
- Isik D, Kaya E, Ngouajio M & Mennan H (2009) Weed suppression in organic pepper (*Capsicum annuum* L.) with winter cover crops. *Crop Protection* **28**: 356-363.
- Isoda IA & Wang P (2002) Leaf temperature and transpiration of field grown cotton and soybean under arid and humid conditions. *Plant Production Science* **5**: 224-228.
- Isoda IA & Shah NH (2006) Adaptive responses of soybean and cotton to diurnal changes in solar radiation and leaf movement. *Asian Journal of Plant Sciences* **5**: 1007-1011.
- Jacobs DF & Timmer VR (2005) Fertilizer-induced changes in rhizosphere electrical conductivity: relation to forest tree seedling root system growth and function. *New Forests* **30**: 147-166.
- Jenkinson DS (2001) The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. *Plant and Soil* **228**: 3-15.
- Jeon J, Lee S, Kim H, Ahn T & Song H (2003) Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *Journal of Microbiology* **41**: 271-276.
- Jin Q, Yao Y, Cai Y & Lin Y (2013) Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium*. *Plos One* **8**: 1-7.
- John RP, Tyagi RD, Prévost D, Brar SK, Pouleur S & Surampalli RY (2010) Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* **29**: 1452-1459.
- Kacprzak M, Asiegbu FO, Daniel G, Stenlid J, Maňka M & Johansson M (2001) Resistance reaction of conifer species (European larch, Norway spruce, Scots pine) to infection by selected necrotrophic damping-off pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 191-207.
- Kai H, Ueda T & Sakaguchi M (1990) Antimicrobial activity of bark-compost extracts. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 983-986.
- Kanazawa S & Filip Z (1986) Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microbial Ecology* **12**: 205-215.
- Kanchana D, Jayanthi M, Usharani G, Saranraj P & Sujitha D (2014) Interaction effect of combined inoculation of PGPR on growth and yield parameters of Chilli Var K1 (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Microbiological Research* **5**: 144-151.
- Kandeler E & Gerber H (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* **6**: 68-72.
- Kang SH, Hyun-Soo C, Hoon C, Choong-Min R, Jihyun FK & Seung-Hwan P (2007) Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**: 96-103.
- Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI & Kim SW (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **91**: 153-156.
- Kao WY & Forseth IN (1992) Diurnal leaf movement, chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in soybean grown under different nitrogen and water availabilities. *Plant, Cell and Environment* **15**: 703-710.
- Kapoor A, Viraraghavan T & Cullimore DR (1999) Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* **70**: 95-104.
- Kawai F (2010) The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 1743-1759.
- Keeling AA, McCallum KR & Beckwith CP (2003) Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. *Bioresource Technology* **90**: 127-132.
- Khalid A, Arshad M & Zahir ZA (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 473-480.
- Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M & Wani PA (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing

- fungi - current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* **56**: 73-98.
- Khan Z, Kandel S, Ramos D, Ettl G, Kim S-H & Doty S (2015) Increased biomass of nursery-grown douglas-fir seedlings upon inoculation with diazotrophic endophytic consortia. *Forests* **6**: 3582-3593.
- Kibblewhite MG, Ritz K & Swift MJ (2008) Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**: 685-701.
- Kim J & Rees DC (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **33**: 389-397.
- Kim MJ, Shim CK, Kim YK, Hong SJ, Park JH, Han EJ, Kim JH & Kim SC (2015) Effect of aerated compost tea on the growth promotion of lettuce, soybean, and sweet corn in organic cultivation. *The Plant Pathology Journal* **31**: 259-268.
- Kim TW, Lee JH, Kim SE, Park MH, Chang HC & Kim HY (2009) Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* **131**: 265-271.
- Kirk TK & Farrell RL (1987) Enzymatic "Combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**: 465-501.
- Kloepper JW, Lifshitz R & Zablutowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* **7**: 39-44.
- Kloepper JW, Tuzun S, Liu L & Wei G (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. *Pest Management: Biologically Based Technologies*, (Egamberdieva D, Shrivastava, S, Varma A ed.) pp. 156-165 American Chemical Society Books, Washington, DC.
- Kloepper JW, Zablutowicz RM, Tipping E & Lifshitz R (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The rhizosphere and plant growth*, (Keister DL, Cregan, PB, ed.) pp. 315-326. Kluwer academic Publishers, Netherlands.
- Kodan A, Kuroda H & Sakai F (2002) A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 3335-3339.
- Koné SB, Dionne A, Tweddell RJ, Antoun H & Avis TJ (2010) Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control* **52**: 167-173.
- Koning RE (1994) Biology of plants tentative schedule. Plant Physiology Information Website.
- Konishi H, Ishiguro K & Komatsu S (2001) A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics* **1**: 1162-1171.
- Kothari SL, Joshi A, Kachhwaha S & Ochoa-Alejo N (2010) Chilli peppers - A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances* **28**: 35-48.
- Kramer SB, Reganold JP, Glover JD, Bohannon BJ & Mooney HA (2006) Reduced nitrate leaching and enhanced denitrifier activity and efficiency in organically fertilized soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4522-4527.
- Krinsky NI (1994) The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* **66**: 1003-1010.
- Krinsky NI (2001) Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* **17**: 815-817.
- Kropff MJ & Walter H (2000) EWRS and the challenges for weed research at the start of a new millennium. *Weed Research* **40**: 7-10.
- Kubota K, Koma D, Matsumiya Y, Chung S-Y & Kubo M (2008) Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation* **19**: 749-757.
- Lambert MJ (1986) Sulphur and nitrogen nutrition and their interactive effects on *Dothistroma infection* in *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Forest Research* **16**: 1055-1062.
- Landeras E, García P, Fernández Y, et al. (2005) Outbreak of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant Disease* **89**: 1015-1015.
- Landis TD (1990) *The container tree nursery manual. Vol.2. Containers and Growing Media*. Agriculture Handbook pp. 674. USDA Forest Service, Portland, OR.
- Landis TD, Tinus RW, McDonald SE & Barnett JP (1989) *Seedling nutrition and irrigation. The container tree nursery manual. Vol. 4* pp. 119. USDA. Washington D.C.
- Lane D (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, (Stackebrandt E, Goodfellow M, ed.) pp. 115-175 Wiley, New York.
- Lapeyrie F, Ranger J & Vairelles D (1991) Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Canadian Journal of Botany* **69**: 342-346.

- Lateef A, Adelere IA & Gueguim-Kana EB (2015) The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia* **70**: 411-419.
- Lavana M, Chauhan PS, Chauhan SVS, Singh HB & Nautiyal CS (2006) Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Current Microbiology* **52**: 363-368.
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A & Gobbetti M (2000) purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4084-4090.
- Lazreg F, Belabid L, Sanchez J, Gallego E, Garrido-Cardenas JA & Elhaitoum A (2013) First report of *Fusarium equiseti* causing damping-off disease on aleppo pine in Algeria. *Plant Disease* **98**: 1268-1268.
- Le Mire G, Nguyen ML, Fassotte B, du Jardin P, Verheggen F, Delaplace P & Jijakli MH (2016) Implementing plant biostimulantes and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **20**: 299-313.
- Leifert C, Li H, Chidburee S, Hampson S, Workman S, Sigeo D, Epton HAS & Harbour A (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Bacteriology* **78**: 97-108.
- Leita L, De Nobili M, Mondini C, Muhlbachova G, Marchiol L, Bragato G & Contin M (1999) Influence of inorganic and organic fertilization on soil microbial biomass, metabolic quotient and heavy metal bioavailability. *Biology and Fertility of Soils* **28**: 371-376.
- LeTacon F & Bouchard D (1986) Effect of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas-fir, Scotch pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecologica*, **7**: 389-402.
- Lewis DH (1973) Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biological Reviews* **48**: 261-277.
- Lim JH & Kim SD (2013) Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *The Plant Pathology Journal* **29**: 201-208.
- Litterick AM, Harrier L, Wallace P, Watson CA & Wood M (2004) The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production—A Review. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**: 453-479.
- Liu D, Lian B & Dong H (2012) Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal* **29**: 413-421.
- Lonvaud-Funel A (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **199**: 9-13.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL & Di Pietro A (1993) Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* **83**: 302-307.
- Lycoskoufis IH, Savvas D & Mavrogianopoulos G (2005) Growth, gas exchange, and nutrient status in pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in recirculating nutrient solution as affected by salinity imposed to half of the root system. *Scientia Horticulturae* **106**: 147-161.
- Ma LP, Qiao XW, Gao F & Hao BQ (2001) Control of sweet pepper *Fusarium* wilt with compost extracts and its mechanism. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* **7**: 84-87.
- Maas EV & Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division* **103**: 115-134.
- Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Abdullah SK, Descals E, Salinas J & Lopez-Llorca LV (2008a) Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 90-105.
- Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Mendgen K & Lopez-Llorca LV (2008b) Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Canadian Journal of Microbiology* **54**: 600-609.
- Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P & Niggli U (2002) Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* **296**: 1694-1697.
- Madsen EL (2011) Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 456-464.
- Mahdi SS, Hassan GI, Samoon SA, Rather HA, Dar SA & Zehra B (2010) Bio-fertilizers in organic agriculture. *Journal of Phytology* **2**: 42-54.
- Mandeel QA (2006) Influence of plant root exudates, germ tube orientation and passive conidia transport on biological control of *Fusarium* wilt by strains of

- nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia* **161**: 173-182.
- Margolis HA, Vézina LP & Ouimet R (1988) Relation of light and nitrogen source to growth, nitrate reductase and glutamine synthetase activity of jack pine seedlings. *Physiologia Plantarum* **72**: 790-795.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- Marschner P & Crowley DE (1996) Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 869-876.
- Marschner P, Kandeler E & Marschner B (2003) Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 453-461.
- Martin FM, Uroz S & Barker DG (2017) Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* **356**: 819-828.
- Martínez FX (2006) Gestión y tratamiento de residuos agrícolas. *Revista técnica de medio ambiente* **168**: 62-74.
- Martínez-Viera R, Dibut B & Yoania R (2010) Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta. *Cultivos Tropicales* **31**. [online].
- Martín-Rodríguez N, Espinel S, Sánchez-Zabala J, Ortiz A, González-Murua C & Duñabeitia MK (2013) Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytologist* **198**: 1215-1227.
- Martín-Rodríguez N, Sánchez-Zabala J, Salcedo I, Majada J, González-Murua C & Duñabeitia MK (2015) New insights into radiata pine seedling root infection by *Fusarium circinatum*. *Plant Pathology* **64**: 1336-1348.
- Matsufuji H, Nakamura H, Chino M & Takeda M (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 3468-3472.
- Matsumoto LS, Martines AM, Avanzi MA, Albino UB, Brasil CB, Saridakis DP, Rampazo LGL, Zangaro W & Andrade G (2005) Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Applied Soil Ecology* **28**: 57-65.
- Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67**: 2318-2331.
- McFee WW & Stone EL (1968) Ammonium and nitrate as nitrogen sources for *Pinus radiata* and *Picea glauca*. *Soil Science Society of America Journal* **32**: 879-884.
- Mendoza D (2010) Vermicompost y compost de residuos hortícolas como componentes de sustratos para la producción de planta ornamental y aromática. Caracterización de los materiales y respuesta vegetal. Tesis, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Merino AN, Fernández-López A, Solla-Gullón F & Edeso JM (2004) Soil changes and tree growth in intensively managed *Pinus radiata* in northern Spain. *Forest Ecology and Management* **196**: 393-404.
- Meyer JM & Abdallah MA (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology* **107**: 319-328.
- Millner PD, Marsh PB, Snowden RB & Parr JF (1977) Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **34**: 765-772.
- Minguez-Mosquera MI & Hornero-Mendez D (1993) Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 1616-1620.
- Mohammadi K (2012) Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resources and Environment* **2**: 80-85.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H & Geiger HH (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**: 6115-6116.
- Moon RC & Itri LM (1984) *The Retinoids*, (Sporn MB, Roberts AB & Goodman, DS, ed.) pp. 327. Academic Press, New York.
- Moraga-Suazo P, Opazo A, Zaldúa S, González G & Sanfuentes E (2011) Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research* **71**: 412-417.
- Moreno J & Moral R (2007) *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

- Morse AM, Nelson CD, Covert SF, Holliday AG, Smith KE & Davis JM (2004) Pine genes regulated by the necrotrophic pathogen *Fusarium circinatum*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 922-932.
- Mumm R & Hilker M (2006) Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends in Plant Science* **11**: 351-358.
- Munimbazi B (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 959-968.
- Murray MG & Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**: 4321-4326.
- Musco A, Sidari M & Mercurio R (2007) Influence of gap size on organic matter decomposition, microbial biomass and nutrient cycle in Calabrian pine (*Pinus laricio*, Poiret) stands. *Forest Ecology and Management* **242**: 412-418.
- Muyzer G, de Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Nagórska K, Bikowski M & Obuchowski M (2007) Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* **54**: 495-508.
- Nagy NE, Fossdal CG, Krokene P, Krekling T, Lønneborg A & Solheim H (2004) Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* **24**: 505-515.
- Nagy NE, Krokene P & Solheim H (2006) Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens. *Tree Physiology* **26**: 159-167.
- Naidu Y, Meon S, Kadir J & Siddiqui Y (2010) Microbial starter for the enhancement of biological activity of Compost Tea. *International Journal of Agriculture and Biology* **12**: 51-56.
- Naidu Y, Meon S & Siddiqui Y (2013) Foliar application of microbial-enriched compost tea enhances growth, yield and quality of muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivated under fertigation system. *Scientia Horticulturae* **159**: 33-40.
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I & Yoshida S (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant Journal* **33**: 887-898.
- Nannipieri P, Kandeler E & Ruggiero P (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications* (Burns RG, Dick RP, ed.), pp. 1-33. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Navarro JM, Garrido C, Carvajal M & Martinez V (2002) Yield and fruit quality of pepper plants under sulphate and chloride salinity. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **77**: 52-57.
- Nelson PE (1981) Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. *Fungal wilt diseases of plants*, (Mace ME, Bell AA & Beckman CH, eds.), pp. 51-78. Academic Press, New York.
- Ngosong C, Jarosch M, Raupp J, Neumann E & Ruess L (2010) The impact of farming practice on soil microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungi: Crop type versus long-term mineral and organic fertilization. *Applied Soil Ecology* **46**: 134-142.
- Nguyen TDT, Kang JH & Lee MS (2007) Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 358-361.
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M & Thonart P (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, agronomy, society and environment* **15**: 327-337.
- Nolard N, Detandt M & Beguin H (1988) Ecology of *Aspergillus* species in the human environment. *Aspergillus and Aspergillosis*, (Vanden Bossche H, Mackenzie DWR & Cauwenbergh G, eds.), pp. 35-41. Springer US, Boston, MA.
- Nolte C & Werner W (1994) Investigations on the nutrient cycle and its components of a biodynamically-managed farm. *Biological Agriculture & Horticulture* **10**: 235-254.
- Ochoa-Alejo N & Ireta-Moreno L (1990) Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annum* L.) cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* **42**: 21-28.
- Ochoa-Alejo N & Ramírez-Malagón R (2001) In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **37**: 701-729.
- O'Donnell K, Cigelnik E & Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493.

- Okabe M, Lies D, Kanamasa S & Park EY (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**: 597-606.
- Olarewaju OE, Adetunji MT, Adeofun CO & Adekunle IM (2009) Nitrate and phosphorus loss from agricultural land: implications for nonpoint pollution. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **85**: 79-85.
- Oliet J (1995) Influencia de la fertilización en vivero sobre la calidad de la planta y la supervivencia en campo de varias especies forestales. Tesis, Universidad de Córdoba, España.
- Oliet J, Segura ML, Martín Domínguez F, Blanco E, Serrada R, López Arias M & Artero F (1999) Los fertilizantes de liberación controlada lenta aplicados a la producción de planta forestal de vivero. Efecto de dosis y formulaciones sobre la calidad de *Pinus halepensis* Mill. *Forest Systems* **8**: 208-228.
- O'Toole GA & Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* **28**: 449-461.
- Palevitch D & Craker LE (1996) Nutritional and medical importance of red pepper (*Capsicum* spp.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **3**: 55-83.
- Palmer AK, Evans KJ & Metcalf DA (2010) Characters of aerated compost tea from immature compost that limit colonization of bean leaflets by *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 1619-1631.
- Pandey A, Trivedi P, Kumar B & Palni LMS (2006) Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology* **53**: 102-107.
- Pant AP, Radovich TJK, Hue NV & Arancon NQ (2011) Effects of vermicompost tea (aqueous extract) on pak choi yield, quality, and on soil biological properties. *Compost Science & Utilization* **19**: 279-292.
- Pant AP, Radovich TJK, Hue NV & Paull RE (2012) Biochemical properties of compost tea associated with compost quality and effects on pak choi growth. *Scientia Horticulturae* **148**: 138-146.
- Paradičković N, Vinković T, Vinković-Vrček I, Žuntar I, Bojić M & Medić-Šarić M (2011) Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**: 2146-2152.
- Paredes-Mendoza M & Espinosa-Victoria D (2010) Organic acids produced by phosphate solubilizing rhizobacteria: a critical review. *Terra Latinoamericana* **28**: 61-70.
- Parham JA & Deng SP (2000) Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1183-1190.
- Pascual I, Azcona I, Aguirreolea J, Morales FN, Corpas FJ, Palma JM, Rellán-Álvarez R & Sánchez-Díaz M (2010) Growth, yield, and fruit quality of pepper plants amended with two sanitized sewage sludges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 6951-6959.
- Patrick W & DeLaune R (1977) Chemical and biological redox systems affecting nutrient availability in the coastal wetlands. *Geoscience and man* **18**: 131-137.
- Patten CL & Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3795-3801.
- Paustian K & Schnürer J (1987) Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: A theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* **19**: 613-620.
- Pedersen EA, Reddy MS & Chakravarty P (1999) Effect of three species of bacteria on damping-off, root rot development, and ectomycorrhizal colonization of lodgepole pine and white spruce seedlings. *European Journal of Forest Pathology* **29**: 123-134.
- Pérez Y, Rebollido R & Martínez J (2010) Isolation and identification of fungi in compost from municipal solid waste. *Agro Sur* **38**: 1-7.
- Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegal M, García-Jiménez J & Armengol J (2007) Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological research* **111**: 832-839.
- Pérez-Soba M & Van der Eerden LJM (1993) Nitrogen uptake in needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) when exposed to gaseous ammonia and ammonium fertilizer in the soil. *Plant and Soil* **153**: 231-242.
- Pfaffl MW (2004) Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR*, (Bustin SA, ed.) pp. 87-112. International University Line, USA, CA.
- Phillips MA & Croteau RB (1999) Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* **4**: 184-190.
- Pimentel D, Hepperly P, Hanson J, Douds D & Seidel R (2005) Environmental, energetic, and economic comparisons of organic and conventional farming systems. *BioScience* **55**: 573-582.

- Pindi PK & Satyanarayana SDV (2012) Liquid microbial consortium- a potential tool for sustainable soil health. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* **3**: 1-9.
- Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P (2001) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York.
- Podile A & Kishore G (2006) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant-associated bacteria*, (Gnanamanickam SS, ed.), pp. 195-230. Springer, Netherlands.
- Pokojska-Burdziej A (1982) The effect of microorganisms, microbial metabolites and plant growth regulators (IAA and GA₃) on the growth of pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). *Polish Journal of Soil Science* **15**: 137-143.
- Powlson DS (1993) Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil Use and Management* **9**: 86-94.
- Prajapat K, Sharma MC & Modi HA (2013) Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on okra (*Abelmoschus esculants*). *International Journal of Research in Agricultural Sciences* **3**: 181-188.
- 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.
- Prieto R, García JL, Mejía JM, Huchín S & Aguilar JL (2009) Producción de planta del género *Pinus* en vivero en clima templado-frío. Campo Experimental Valle del Guadiana INIFAP-SAGARPA. Durango, México. **48**.
- Probanza A, Lucas García JA, Ruiz Palomino M, Ramos B & Gutiérrez Mañero FJ (2002) *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* **20**: 75-84.
- Puglisi E, Pascazio S, Suciú N, Cattani I, Fait G, Spaccini R, Crecchio C, Piccolo A & Trevisan M (2013) Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration* **129**: 82-94.
- Raison RJ & Myers BJ (1992) The biology of forest growth experiment: linking water and nitrogen availability to the growth of *Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management* **52**: 279-308.
- Rajakumar GS & Nandy SC (1983) Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 525-527.
- Ramírez C & Martínez AT (1981) Seven new species of *Penicillium* and a new variety of *Penicillium novae-caledoniae* Smith. *Mycopathologia* **74**: 35-49.
- Ravishankar GA, Suresh B, Giridhar P, Rao SR & Johnson TS (2003) Biotechnological studies on *Capsicum* metabolite production and plant improvement. *Capsicum: The genus Capsicum*, (De AK, ed.) pp. 100. CRC Press, London.
- Reglinski T, Taylor JT & Dick MA (2004) Chitosan induces resistance to pitch canker in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science* **31**: 49-58.
- Riah W, Laval K, Laroche-Ajzenberg E, Mougín C, Latour X & Trinsoutrot-Gattin I (2014) Effects of pesticides on soil enzymes: A review. *Environmental Chemistry Letters* **12**: 257-273.
- Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**: 933-956.
- Rice-Evans CA, Miller N & Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**: 152-159.
- Richard S, Lapointe G, Rutledge RG & Séguin A (2000) Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and Jasmonate. *Plant and Cell Physiology* **41**: 982-987.
- Richardson AD, Aikens M, Berlyn GP & Marsh P (2004) Drought stress and paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings: effects of an organic biostimulant on plant health and stress tolerance, and detection of stress effects with instrument-based, noninvasive methods. *Journal of Arboriculture* **30**: 52-60.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM & Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* **321**: 305-339.
- Rietveld WJ (1989) Transplanting stress in bareroot conifer seedlings: its development and progression to establishment. *Northern Journal of Applied Forestry* **6**: 99-107.
- Rippy JFM, Peet MM, Louis FJ & Nelson PV (2004) Plant development and harvest yield of greenhouse tomatoes in six organic growing systems. *HortScience* **39**: 223-229.
- Rivera ME, Codina JC, Olea F, De Vicente A & Pérez-García A (2002) Differential expression of B-1,3-glucanase in susceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Sphaerotheca fusca*.

- Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 257-265.
- Robertson RA (1993) Peat, horticulture and environment. *Biodiversity and Conservation* **2**: 541-547.
- Rodríguez H & Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* **17**: 319-339.
- Romanyà J & Vallejo VR (2004) Productivity of *Pinus radiata* plantations in Spain in response to climate and soil. *Forest Ecology and Management* **195**: 177-189.
- Rotella A (2005) Manejo del hongo *Fusarium circinatum* en viveros forestales. Concepción, Chile.
- Roux J, Eisenberg B, Kanzler A, Nel A, Coetzee V, Kietzka E & Wingfield MJ (2007) Testing of selected south african pinus hybrids and families for tolerance to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *New Forests* **33**: 109-123.
- Ruano R (2003) *Viveros forestales. Manual de cultivo y proyectos*. Mundi-Prensa.
- Ruiter P, Neutel A & Moore J (1995) Energetics, patterns of interaction strengths, and stability in real ecosystems. *Science* **269**: 1257-1260.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ & Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* **278**: 1-9.
- Rylski I & Spigelman M (1982) Effects of different diurnal temperature combinations on fruit set of sweet pepper. *Scientia Horticulturae* **17**: 101-106.
- Saborío F (2002) Bioestimulantes en la fertilización foliar; principios y aplicaciones. *Memorias del Laboratorio de Suelos y Foliars*, (Meléndez GM, ed.) pp. 107-124. Centro de Investigaciones Agronómicas, Costa Rica.
- Sala MM, Pinhassi J & Gasol JM (2006) Estimation of bacterial use of dissolved organic nitrogen compounds in aquatic ecosystems using Biolog plates. *Aquatic Microbial Ecology* **42**: 1-5.
- Samadi R, Arzanlou M, Ghosta Y & Houbraken J (2016) Three *Penicillium* species new for the mycobiota of Iran from soils of the National Park of Urmia Lake. *Rostaniha* **17**: 128-135.
- Sánchez-Rodríguez F, Rodríguez-Soalleiro R, Español E, López CA & Merino A (2002) Influence of edaphic factors and tree nutritive status on the productivity of *Pinus radiata* D. Don plantations in northwestern Spain. *Forest Ecology and Management* **171**: 181-189.
- Sánchez-Zabala J (2013) Biotecnología forestal aplicada a la mejora de la producción de *Pinus radiata* D. Don y *Pinus pinaster* Ait. Tesis, Universidad del País Vasco, Leioa, Vizcaya.
- Sánchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodrigues N, González-Murua C, Ortega U, Alonso-Graña M, Arana O & Duñabeitia MK (2013) Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza* **23**: 627-640.
- Sane SA & Mehta SK (2015) Isolation and evaluation of rock phosphate solubilizing fungi as potential biofertilizer. *Journal of Fertilizers & Pesticides* **6**: 156-161.
- Scharenbroch BC, Treasurer W, Catania M & Brand V (2011) Laboratory assays on the effects of aerated compost tea and fertilization on biochemical properties and denitrification in A silt loam and Bt clay loam soils. *Arboriculture and Urban Forestry* **37**: 269-277.
- Scharroba A, Kramer S, Kandeler E & Ruess L (2016) Spatial and temporal variation of resource allocation in an arable soil drives community structure and biomass of nematodes and their role in the micro-food web. *Pedobiologia* **59**: 111-120.
- Schellke M & Peterson RL (1997) Suppression of common root pathogens by helper bacteria and ectomycorrhizal fungi in vitro. *Mycorrhiza* **6**: 481-485.
- Scheuerell SJ & Mahaffee WF (2002) Compost Tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization* **10**: 313-338.
- Scheuerell SJ & Mahaffee WF (2004) Compost Tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* **94**: 1156-1163.
- Scheuerell SJ & Mahaffee WF (2006) variability associated with suppression of gray mold (*Botrytis cinerea*) on geranium by foliar applications of nonaerated and aerated compost teas. *Plant Disease* **90**: 1201-1208.
- Schjøning P, Elmholt S, Munkholm LJ & Debosz K (2002) Soil quality aspects of humid sandy loams as influenced by organic and conventional long-term management. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **88**: 195-214.
- Schroeder D, Schaerer HM & Stinson CSA (1993) A European weed survey in 10 major crop systems to identify targets for biological control. *Weed Research* **33**: 449-458.
- Schweigkofler W, O'Donnell K & Garbelotto M (2004) Detection and quantification of airborne conidia of

- Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and environmental microbiology* **70**: 3512-3520.
- Selvakumar G, Mohan M, Kundu S, Gupta AD, Joshi P, Nazim S & Gupta HS (2008) Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in Applied Microbiology* **46**: 171-175.
- Seybold CA, Mersie W, Huang J & McNamee C (2002) Soil redox, pH, temperature, and water-table patterns of a freshwater tidal wetland. *Wetlands* **22**: 149-158.
- Shaharoon B, Naveed M, Arshad M & Zahir ZA (2008) Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**: 147-155.
- Shekelle R, Liu S, Raynor W, Lepper M, Maliza C, Rossio A, Paul O, Shryock A & Stamler J (1981) Dietary vitamin a and risk of cancer in the western electric study. *The Lancet* **318**: 1185-1190.
- Shen FT, Ho MJ, Huang HR, Arun AB, Rekha PD & Young CC (2008) Molecular detection and phylogenetic characterization of *Gordonia* species in heavily oil-contaminated soils. *Research in Microbiology* **159**: 522-529.
- Siddiqui Y, Meon S, Ismail R & Rahmani M (2009) Bio-potential of compost tea from agro-waste to suppress *Choanephora cucurbitarum* L. the causal pathogen of wet rot of okra. *Biological Control* **49**: 38-44.
- Slangen JHG & Kerkhoff P (1984) Nitrification inhibitors in agriculture and horticulture: A literature review. *Fertilizer research* **5**: 1-76.
- Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, Liu WT & Forney L (1998) Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1220-1225.
- Smil V (1999) Detonator of the population explosion. *Nature* **400**: 415-415.
- Snoeiijers SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ & De Wit PJGM (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 493-506.
- Srinivasarao CH & Kundu S (2017) Potassium management for mitigation of biotic and abiotic stresses in plants under changing climates. *Indian Journal of Fertilizers* **13**: 46-55.
- Srivastava R, Khalid A, Singh US & Sharma AK (2010) Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici for the management of tomato wilt. *Biological Control* **53**: 24-31.
- St. Martin CCG & Brathwaite RAI (2012) Compost and compost tea: Principles and prospects as substrates and soil-borne disease management strategies in soil-less vegetable production. *Biological Agriculture & Horticulture* **28**: 1-33.
- Steenkamp ET, Rodas CA, Kvas M & Wingfield MJ (2012) *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology* **41**: 483-491.
- Stefanelli D, Goodwin I & Jones R (2010) Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Research International* **43**: 1833-1843.
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* **56**: 845-857.
- Stoate C, Boatman ND, Borralho RJ, Carvalho CR, Snoo GRD & Eden P (2001) Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* **63**: 337-365.
- Ström K, Sjögren J, Broberg A & Schnürer J (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the anti-fungal cyclic dipeptides cyclo (l-phe-l-pro) and cyclo (l-phe-trans-4-oh-l-pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4322-4327.
- Tariq M, Ali Q, Khan A, Khan GA, Rashid B, Rahi MS, Ali A, Nasir IA & Husnain T (2014) Yield potential study of *Capsicum annuum* L. under the application of PGPR. *International Journal "Advancements in Life Sciences"* **1**: 202-207.
- Taylor JP, Wilson B, Mills MS & Burns RG (2002) Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 387-401.
- Tedersoo L, Pärtel K, Jairus T, Gates G, Pöldmaa K & Tamm H (2009) Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environmental Microbiology* **11**: 3166-3178.
- Tedersoo L, Bahram M, Pölme S, et al. (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**: 1052-1053.

- Tekaia F & Latgé JP (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology* **8**: 385-392.
- Theodorou C & Bowen GD (1969) The influence of pH and nitrate on Mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D. Don. *Australian Journal of Botany* **17**: 59-67.
- Thompson B (1985) Seeling morphological evaluation. What can you tell by looking. *Evaluating seeling quality: principles, procedures and predictive abilities of major test Forest Research Laboratory*, (Durges MLE, ed.) pp. 59-71. Oregon State University. Corvallis, USA, OR.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R & Polasky S (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671-677.
- Tout D (1990) The horticulture industry of Almería province, Spain. *The Geographical Journal* **156**: 304-312.
- Treseder KK & Allen MF (2002) Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist* **155**: 507-515.
- Trevors JT (1984) Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* **16**: 673-674.
- Tripura C, Sashidhar B & Podile AR (2007) Ethyl methanesulfonate mutagenesis-enhanced mineral phosphate solubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. *Current Microbiology* **54**: 79-84.
- Turner S, Meyer-Stüve S, Schippers A, Guggenberger G, Schaarschmidt F, Wild B, Richter A, Dohrmann R & Mikutta R (2017) Microbial utilization of mineral-associated nitrogen in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **104**: 185-196.
- Tzortzakis N, Gouma S, Dagianta E, Saridakis C, Papatichalaki M, Goumas D & Manios T (2012) Use of Fertigation and Municipal Solid Waste Compost for Greenhouse Pepper Cultivation. *The Scientific World Journal* **2012**: 1-8.
- Urrestarazu M, Suárez-Estrella F & Mazuela P (2005) Reutilización de los residuos derivados de la industria hortícola. *Vida rural* **220**: 26-29.
- Vainio EJ & Hantula J (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* **104**: 927-936.
- Vallad GE & Goodman RM (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* **44**: 1920-1934.
- Vallaeyts T, Topp E, Muyzer G, Macheret V, Laguerre G, Rigaud A & Soulas G (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 279-285.
- Van Bruggen AHC & Semenov AM (2000) In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* **15**: 13-24.
- Van den Berg MA, Albang R, Albermann K, et al. (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology* **26**: 1161-1168.
- Van den Driessche R (1991) Influence of container nursery regimes on drought resistance of seedlings following planting. II. Stomatal conductance, specific leaf area, and root growth capacity. *Canadian Journal of Forest Research* **21**: 566-572.
- Van den Driessche R (1992) Changes in drought resistance and root growth capacity of container seedlings in response to nursery drought, nitrogen, and potassium treatments. *Canadian Journal of Forest Research* **22**: 740-749.
- Van Diepeningen AD, de Vos OJ, Korthals GW & van Bruggen AHC (2006) Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology* **31**: 120-135.
- Van Etten H, Mansfield JW, Bailey JA & Farmer EE (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant & cell physiology* **6**: 1191-1192.
- Van Trump JI, Wrighton KC, Thrash JC, Weber KA, Andersen GL & Coates JD (2011) Humic acid-oxidizing, nitrate-reducing bacteria in agricultural soils. *mBio* **2**: 1-9.
- Vaughan EE, Heilig HGHJ, Ben-Amor K & de Vos WM (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 477-490.
- Veluthakkal R & Dasgupta MG (2010) Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees* **24**: 993-1006.
- Verkleij FN (1992) Seaweed extracts in agriculture and horticulture: a review. *Biological Agriculture & Horticulture* **8**: 309-324.

- Verma P, Yadav AN, Khannam KS, Saxena AK & Suman A (2017) Potassium-solubilizing microbes: diversity, distribution, and role in plant growth promotion. *Microorganisms for green revolution Vol 1: Microbes for sustainable crop production*, (Panpatte DG, Vyas RV, Shelat HN, ed.) Springer Nature, Singapur.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571-586.
- Vieira RF & Almeida RA (2016) Microbial activities in soil cultivated with corn and amended with sewage sludge. *SpringerPlus* **5**: 1844-1860.
- Viljoen A, Wingfield MJ & Marasas WFO (1994) First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* **78**: 309-312.
- Villar-Luna E, Rojas-Martínez R, Reyes-Trejo B, Rocha-Sosa M & Zavaleta-Mejía E (2015) Expresión del gen HMG2 (Hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2) en Chile (*Capsicum annuum* L.) CM334 infectado por *Nacobbus aberrans* y *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* **49**: 69-75.
- Visagie CM, Seifert KA, Houbraken J, Samson RA & Jacobs K (2014) Diversity of *Penicillium* section Citrina within the fynbos biome of South Africa, including a new species from a *Protea repens* infructescence. *Mycologia* **106**: 537-552.
- Wahyudi AT, Astuti RP, Widyawati A, Meryandini A & Nawangsih AA (2011) Characterization of *Bacillus* sp. Strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* **3**: 34-40.
- Wang D, Eyles A, Mandich D & Bonello P (2006) Systemic aspects of host-pathogen interactions in Austrian pine (*Pinus nigra*): A proteomics approach. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 149-157.
- Wang Z-Y (2012) Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 7-8.
- Warren CR & Adams MA (2002) Possible causes of slow growth of nitrate-supplied *Pinus pinaster*. *Canadian Journal of Forest Research* **32**: 569-580.
- Watanabe M, Tanaka YK, Togami K & Yokota A (2008) Evaluation of gene index for identification of *Byssoschlamys* spp. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **49**: 82-87.
- Wei Q, Liao Y, Chen Y, Wang SH, Xu Y, Tang L, Chen F & Eloff JN (2005) Isolation, characterisation and antifungal activity of B-1,3-Glucanase from seeds of *Jatropha curcas*. *South African Journal of Botany* **71**: 95-99.
- Weinberger K & Lumpkin TA (2007) Diversification into horticulture and poverty reduction: A research agenda. *World Development* **35**: 1464-1480.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- Welke SE (2005) The effect of compost extract on the yield of strawberries and the severity of *Botrytis cinerea*. *Journal of Sustainable Agriculture* **25**: 57-68.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**: 307-313.
- Weltzien HC (1990) *The use of composted materials for leaf disease suppression in field crops*. Vol. 45. Monograph British Crop Protection Council. pp. 115-120.
- Weltzien HC (1991) Biocontrol of foliar fungal disease with compost extracts. *Microbial Ecology of Leaves*, (Andrews JH, Hirano SS, ed.) pp. 430-450. Springer-Verlag, New York, USA.
- White TJ, Bruns TD, Lee S & Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TJ, eds.) Academic, San Diego.
- Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD & Coutinho TA (2008) Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* **37**: 319-334.
- Wingfield MJ, Jacobs A, Coutinho TA, Ahumada R & Wingfield BD (2002) First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology* **51**: 397-397.
- Wingfield MJ, Slippers B, Roux J & Wingfield BD (2001) Worldwide movement of exotic forest fungi, especially in the tropics and the southern hemisphere. *BioScience* **51**: 134-140.
- Witzell J & Martín JA (2008) Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens – past experiences and future prospects. *Canadian Journal of Forest Research* **38**: 2711-2727.
- Wu SC, Cao ZH, Li ZG, Cheung KC & Wong MH (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* **125**: 155-166.

- Xu D, Raza W, Yu G, Zhao Q, Shen Q & Huang Q (2012) Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**: 1193-1201.
- Yamada K, Lim J, Dale JM, *et al.* (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* **302**: 842-846.
- Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y & Chet I (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* **235**: 235-242.
- Yin H, Zhao X & Du Y (2010) Oligochitosan: A plant diseases vaccine – A review. *Carbohydrate Polymers* **82**: 1-8.
- Yohalem DS, Harris RF & Andrews JH (1994) Aqueous extracts of spent mushroom substrate for foliar disease control. *Compost Science & Utilization* **2**: 67-74.
- Yu O & Jez JM (2008) Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *The Plant Journal* **54**: 750-762.
- Zabka M & Pavela R (2013) Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* **93**: 1051-1056.
- Zahir ZA, Arshad M & Frankenberger WT (2003) Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* **81**: 97-168.
- Zas R & Serrada R (2003) Foliar nutrient status and nutritional relationships of young *Pinus radiata* D. Don plantations in northwest Spain. *Forest Ecology and Management* **174**: 167-176.
- Ziegler K, Nemeth K & Mengel K (1992) Relationship between electroultrafiltration (EUF) extractable nitrogen, grain yield, and optimum nitrogen fertilizer rates for winter wheat. *Fertilizer research* **32**: 37-43.
- Zucconi F & Bertoldi M (1987) Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. *Compost: production, quality and use*, (De Bertoldi M, Ferranti MP, L'Hermite MP, Zucconi F, eds.) pp. 30-50. Elsevier Applied Science, Essex.



Anexos



ANEXO I. TABLAS DE DATOS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Valores de actividad enzimática de las poblaciones microbianas de la figura 4.2A, indicando valor promedio y error estándar.

		Deshidrogenasa	Ureasa	Arilsulfatasa	F. ácida	F. alcalina	β-Glucosaminidasa
Agua	Promedio	9,64E+02	1,83E+04	7,15E+03	1,11E+05	5,02E+04	4,80E+04
	SE	8,22E+01	1,02E+03	1,63E+03	1,17E+04	8,27E+03	1,72E+03
Convencional	Promedio	6,87E+02	1,37E+04	1,78E+04	1,18E+05	5,22E+04	6,33E+03
	SE	2,72E+01	3,06E+02	3,66E+03	1,12E+04	3,29E+03	9,45E+02
TCA	Promedio	8,60E+02	1,60E+04	1,67E+04	1,39E+05	4,74E+04	2,44E+04
	SE	4,02E+01	1,50E+03	2,13E+03	1,15E+04	1,36E+04	3,88E+03

Valores de actividad enzimática de las poblaciones microbianas de la figura 4.2B, indicando valor promedio y error estándar.

		Deshidrogenasa	Ureasa	Arilsulfatasa	F. ácida	F. alcalina	β-Glucosaminidasa
Agua	Promedio	6,78E+03	1,52E+04	1,66E+04	2,84E+04	5,71E+04	3,47E+03
	SE	9,01E+02	4,92E+02	3,54E+02	1,59E+03	1,16E+03	2,38E+02
Convencional	Promedio	5,81E+03	1,16E+04	1,22E+04	3,05E+04	5,86E+04	4,54E+03
	SE	5,83E+02	5,49E+02	1,07E+03	4,43E+02	4,08E+03	9,44E+01
TCA	Promedio	5,22E+03	1,33E+04	1,38E+04	3,01E+04	5,57E+04	4,68E+03
	SE	2,51E+02	3,31E+02	8,20E+02	1,01E+03	3,55E+03	1,81E+02

Valores de actividad enzimática de las poblaciones microbianas de la figura 4.2C, indicando valor promedio y error estándar.

		Deshidrogenasa	Ureasa	Arilsulfatasa	F. ácida	F. alcalina	β-Glucosaminidasa
Agua	Promedio	1,29E+04	7,81E+04	5,05E+04	2,30E+05	3,08E+05	2,72E+04
	SE	3,13E+02	5,72E+03	5,50E+02	2,78E+03	2,05E+04	6,38E+02
Convencional	Promedio	2,43E+04	8,88E+04	5,31E+04	2,60E+05	2,86E+05	2,65E+04
	SE	4,82E+02	5,47E+03	3,17E+03	1,99E+04	1,35E+04	3,80E+02
TCA	Promedio	1,56E+04	8,55E+04	4,07E+04	2,01E+05	2,71E+05	2,16E+04
	SE	8,43E+02	4,77E+03	9,58E+02	1,66E+04	5,05E+03	6,10E+02

Valores de actividad enzimática de las poblaciones microbianas de la figura 5.2 con fertilización convencional, indicando valor promedio y error estándar.

		Deshidrogenasa	Ureasa	Arilsulfatasa	F. ácida	F. alcalina	β-Glucosaminidasa
Arenoso	Promedio	9,61E+03	6,06E+03	8,94E+03	2,60E+04	3,49E+04	3,62E+03
Convencional	SE	1,04E+02	7,04E+02	2,32E+02	1,38E+03	1,80E+02	2,05E+02
Arcilloso	Promedio	1,08E+04	2,67E+04	2,74E+04	4,38E+04	7,56E+04	8,92E+03
Convencional	SE	4,28E+02	1,30E+03	1,88E+03	1,50E+03	3,72E+03	1,60E+03
IAS	Promedio	9,87E+03	2,29E+04	3,00E+04	5,75E+04	8,72E+04	9,72E+03
Convencional	SE	1,03E+02	4,86E+03	2,59E+03	3,22E+03	5,56E+03	2,63E+02

Valores de actividad enzimática de las poblaciones microbianas de la figura 5.2 con TCA, indicando valor promedio y error estándar.

		Deshidrogenasa	Ureasa	Arilsulfatasa	F. ácida	F. alcalina	β-Glucosaminidasa
Arenoso	Promedio	9,05E+03	2,23E+04	2,73E+04	3,91E+04	5,78E+04	7,34E+03
TCA	SE	2,43E+01	1,18E+03	7,60E+02	1,61E+03	9,52E+02	7,70E+02
Arcilloso	Promedio	9,63E+03	1,91E+04	2,57E+04	4,38E+04	7,63E+04	7,44E+03
TCA	SE	4,42E+02	1,14E+03	9,24E+02	3,86E+03	4,88E+03	6,82E+02
IAS	Promedio	9,25E+03	1,41E+04	1,26E+04	3,76E+04	4,99E+04	5,66E+03
TCA	SE	4,48E+01	7,03E+02	2,41E+02	8,64E+02	3,81E+03	3,03E+02

Valores de actividad enzimática de las poblaciones microbianas de la figura 6.2, indicando valor promedio y error estándar.

		Deshidrogenasa	Ureasa	Arilsulfatasa	F. ácida	F. alcalina	β-Glucosaminidasa
Agua	Promedio	1,21E+03	1,48E+04	3,03E+04	1,75E+05	1,96E+05	7,66E+04
	SE	6,42E+02	1,48E+03	1,26E+03	1,81E+04	6,91E+03	3,34E+03
Convencional	Promedio	4,06E+02	9,94E+03	2,29E+04	1,18E+05	7,53E+04	1,54E+05
	SE	1,23E+02	6,99E+02	8,06E+03	4,75E+03	6,41E+03	1,20E+04
TCA	Promedio	3,40E+03	1,55E+04	3,55E+04	1,70E+05	2,06E+05	1,46E+05
	SE	3,02E+02	7,72E+02	8,04E+03	7,03E+03	6,36E+03	1,56E+04

ANEXO II. COMPOSICIÓN DE TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Tampón de infiltración de la NRasa (para 1L)

KH_2PO_4	1,08 g
K_2HPO_4	7,32 g
EDTA- Na_2	0,37 g
KNO_3	5,05 g
Propanol	30 mL

Ajustar pH a 7,5.

Tampón de extracción de la GS

Compuesto	Concentración final
Glicerol (v/v)	10%
BSA	0,05%
Tritón X-100 (v/v)	0,1%
Hepes-KOH pH 7,5	50 mM
MgCl_2	10 mM
EDTA- Na_2	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	10 mM
PMSF	1 mM
δ -aminocaprónico	1 mM
Leupeptina	0,005 mM

Tampón de reacción de la GS

Compuesto	Concentración final
Tris-HCl pH 7,6	50 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 mM
Glutamato monosódico	80 mM
Hidroxilamina	6 mM
EDTA- Na_2	4 mM
ATP (alícuotas)	8 mM
Agua miliQ	Enrasar

Tampón de parada de la GS (para 250 mL)

FeCl_3	4,05 g
TCA o Tricloroacético	9,80 g
HCl	7,86 mL de HCl 32%

Tampón Skujins 0,1M (para 1L)

Tris-hidroximetil-aminometano	12,1 g
Ácido maleico	11,6 g
Ácido cítrico	14 g
Ácido bórico	6,28 g
NaOH 1N	488 mL

Enrasar después hasta 1L y ajustar el pH según la actividad deseada.

Tampón PBS 10x o fosfato-salino (para 1L)

NaCl	80,6 g
KCl	2,2 g
Na_2HPO_4	11,5 g
KH_2PO_4	2,0 g

Comprobar que el pH sea de 7,4 una vez llevado a 1x. La adición de EDTA- Na_2 0,5M a pH 8 permite eliminar agregados celulares.

Tampón TAE 50x (para 1L)

- Disolver 242,2 g de Tris-HCl en 600 mL de agua ultrapura
- Añadir 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5M a pH 8
- Aforar a 1 Litro

Tampón mixto de carga 6x para DNA

- 25 mg de Azul de Bromofenol
- 25 mg de Xileno Cianol
- 3 mL de Glicerol
- Aforar a 10 mL con H₂O ultrapura

Medio Modified Melin-Norkrans sólido (MMN) - medio indicado para cultivo de ectomicorrizas

- Añadir 10 mL de las siguientes concentraciones madre:

CaCl ₂	5 g/L
NaCl	2,5 g/L
KH ₂ PO ₄	50 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	25 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15 g/L
Sequestrene (7% Fe)	2 g/L

- Añadir 1 mL de Tiamina (0,1 g/L)
- Añadir 10 g de Dextrosa (D-glucosa), 3 g de extracto de malta y 15 gramos de agar técnico

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 5,5 ± 0,2. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio Luria-Bertani (LB) - medio de cultivo universal para bacterias

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar bacteriológico	10 g
Cloranfenicol (opcion.)	0,03%

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,2 ± 0,2. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio Potato Dextrose Agar (PDA) - medio de cultivo universal para hongos saprobios

Extracto de patata	4 g
Dextrosa	20 g
Agar técnico	15 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 5,6 ± 0,2. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio Cetrimida - medio selectivo para *Pseudomonas* spp.

Peptona de gelatina	20 g
K ₂ SO ₄	10 g
MgCl ₂	1,4 g
Cetrimida	0,3 g
Glicerol	10 mL
Agar bacteriológico	15 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,2 ± 0,2. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio Pikovskaya (PKV) - medio diferencial para solubilizadores de fósforo

Glucosa	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
NaCl	0,2 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,002 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,002 g
Agar bacteriológico	15 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,0 ± 0,2. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio Pikovskaya-modificado (PKV modificado) - medio diferencial para solubilizadores de potasio

Glucosa	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
NaCl	0,2 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,004 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,002 g
Agar bacteriológico	15 g
Púrpura de Bromocresol	0,1 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,0 ± 0,2. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

11. Anexos

Medio Nitrogen Free Bromothymol blue (NFB) - medio diferencial para fijadores de nitrógeno

Sacarosa	5 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
CaSO ₄	0,1 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,04 g
MoO ₃	0,001 g
Agar bacteriológico	15 g
Azul de Bromocresol	0,5 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a $7,0 \pm 0,2$. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) - medio selectivo para ciertos géneros de hongos filamentosos y levaduras

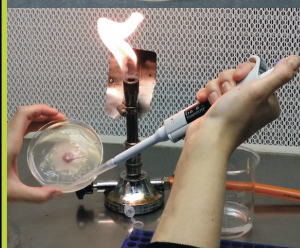
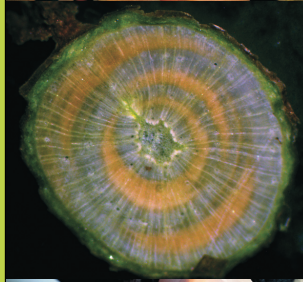
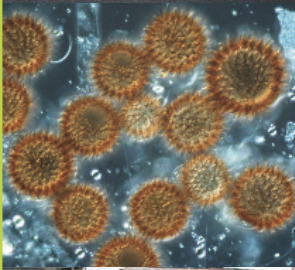
Dextrosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar técnico	15 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a $6,6 \pm 0,2$. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.

Medio DeMan, Rogosa and Sharpe (MRS) - medio selectivo para microorganismos ácido-lácticos

Dextrosa	20 g
Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Acetato de sodio	5 g
Extracto de levadura	5 g
Citrato hidrógeno diamonio	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄	0,1 g
MnSO ₄	0,05 g
Agar bacteriológico	12 g

Disolver en 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a $6,5 \pm 0,2$. Esterilizar, atemperar a 50°C y plaquear.



Un suelo sano se define como aquel sistema que tiene resiliencia al estrés, gran diversidad biológica, y complejos niveles de ciclos internos de nutrientes. Un manejo responsable es importante para todos los sistemas agroforestales, ya que se ha demostrado que estos sistemas son especialmente sensibles a la degradación y que un mantenimiento pobre causa erosión, pérdida de materia orgánica, contaminación, compactación y excesiva salinidad. La adición de fertilizantes con alto contenido en nitrógeno y fósforo provee a las plantas de nutrientes rápidamente asimilables, incrementando la producción, pero en muchas ocasiones dañándolo a largo plazo. Por el contrario, la filosofía de la fertilización orgánica se centra precisamente en prácticas basadas en los ciclos ecológicos, cuya finalidad es frenar el impacto ambiental de la agricultura intensiva, proporcionando una sostenibilidad del sistema a la largo plazo y reduciendo al mínimo el uso de recursos no renovables. Nuestro trabajo demuestra que el uso de té de compost como biofertilizante mejora el estado fisiológico de la planta, estimula su crecimiento e incrementa su producción; además, favorece su sistema inmune, fortaleciéndola frente a patógenos. Es de destacar, que su aplicación en el suelo no sólo no altera los parámetros físico-químicos, ni la diversidad microbiana con respecto a un suelo sin fertilizar, sino que además induce sinergias que favorecen al sistema suelo-planta.