



DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES  
Y BIODIVERSIDAD

**ANÁLISIS DEL VALOR AGRONÓMICO DE LOS  
BIOFERTILIZANTES BASADOS EN RIZOBIOS,  
EN LOS CULTIVOS EXTENSIVOS DE CEREAL**

**ANALYSIS OF AGRICULTURAL VALUE BASED ON  
RHIZOBIA BIOFERTILIZERS, IN CEREAL CROPS**

TESIS DOCTORAL

Rebeca Mulas García

2015





DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES  
Y BIODIVERSIDAD

**TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS DEL VALOR AGRONÓMICO DE LOS  
BIOFERTILIZANTES BASADOS EN RIZOBIOS,  
EN LOS CULTIVOS EXTENSIVOS DE CEREAL**

**ANALYSIS OF AGRICULTURAL VALUE BASED ON  
RHIZOBIA BIOFERTILIZERS, IN CEREAL CROPS**

*Directores:*

*Dr. Fernando González Andrés*

*Dr. Javier Brañas Lasala*

*Tesis presentada por*

**Rebeca Mulas García**

*para optar al título de Doctor*

*León 2015*



***Dedicatoria:***

*A mi padre,  
por enseñarme a amar la tierra y la naturaleza,  
y a mi madre,  
por mostrarme como sembrar con paciencia las semillas  
de la vida para mañana recoger los frutos.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue posible gracias a la empresa FERTIBERIA, por su apoyo tanto económico como moral en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores Fernando González (Universidad de León) y Javier Brañas (Fertiberia S.A), por su decidida fe en mí y en mi trabajo, por su esfuerzo, dedicación, confianza y sus ánimos en los momentos que más los necesitaba.

Me gustaría agradecer su colaboración para la realización de este trabajo a los integrantes del Departamento de I + D + i de Fertiberia Jose Manuel, Pablo, Rocío y Cinta. A AIMCRA en Sevilla, a Joao en ADP Fertilizantes y a Manuela de la Escuela Superior Agraria de Beja, en Portugal,

De igual modo, agradecer a Raúl, Esther, Jose David y Pilar y muy especialmente a Encarna Velázquez su gran ayuda y apoyo desde el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca. En el IRNASA, me gustaría mostrar mi agradecimiento a Alvaro Peix.

También me gustaría agradecer a Antonio, Xiomar, Marta Elena, Juan y Beatriz toda su disponibilidad y ayuda en mi formación. A mis compañeros Raquel, Begoña, Rubén, Rubén M., Camino, Diego, Natalia, Guillermo, Raúl, Isabel y al resto de los integrantes del Instituto de Recursos Naturales y Medio Ambiente, su apoyo y su compañía. A mis compañeros del Instituto de la Viña y el Vino Jose Manuel, Marusela, Rebeca y Sandra su ayuda y sus ánimos. También gracias a Tina, por alegrarme cada mañana difícil de trabajo.

Agradecer a mis padres sus animos y su cariño. Y a mi hermano Daniel su ayuda durante este tiempo.

Por último, agradecer a Rodri su compañía, apoyo y confianza.





## RESUMEN

A día de hoy los científicos estudian el suelo como un ecosistema en el cual los microorganismos juegan un papel muy importante en las continuas transformaciones que se producen. Además recientes estudios han demostrado que dichos microorganismos pueden mejorar la absorción de nutrientes por las plantas e incrementar la eficiencia en el uso de los fertilizantes químicos. Dado que la nutrición vegetal depende de la capacidad del suelo para suministrar los elementos nutritivos en la forma, cantidad y momento adecuado a las exigencias del mismo, en muchas ocasiones cuando esta circunstancia no se cumple, se hace necesario el aporte de fertilizantes minerales. Con el fin de optimizar la producción de los cultivos agrícolas y de minimizar las pérdidas de fertilizantes al medio ambiente, en esta tesis se ha evaluado el efecto de la utilización de microorganismos rizosféricos junto con el fertilizante en cereales de invierno.

El objetivo de este trabajo fue analizar el valor agronómico de los rizobios combinados con fertilizantes minerales en cultivos extensivos de cereal. La investigación se desarrolló de la siguiente manera. En primer lugar, se estudió la viabilidad de la tecnología que se pretendía desarrollar, evaluando la supervivencia de los rizobios en la superficie del fertilizante mineral sólido (un medio teóricamente hostil), y el mantenimiento de los efectos esperados de los microorganismos. Una vez comprobados los resultados positivos, se realizó una selección completa de cuatro cepas a partir de una colección de *Rhizobium leguminosarum* edáficos autóctonos de Castilla y León, en base a sus efectos PGP específicos. Posteriormente se determinó la dosis óptima de aplicación del rizobio al fertilizante y por último, se realizó una validación agronómica de los formulados desarrollados, primero a nivel de microcosmos y después en campo. Adicionalmente se estudió el tipo de simbiosis que se establecía entre las raíces de la planta y el rizobio. Por último, se realizó un estudio del impacto ambiental y económico de las soluciones propuestas.

Se observó mediante ensayo de microcosmos como la cepa de *Rhizobium* fue capaz de sobrevivir durante la duración del ensayo, a pesar de estar en contacto directo con los gránulos de fertilizante, e incluso de mejorar el crecimiento de las plantas de trigo.

La selección de microorganismos a emplear en esta investigación se llevó a cabo en base a sus propiedades de estimulación del crecimiento o PGP, entre las cuales se evaluó la producción de ácido indolacético, la solubilización de fósforo mineral, la producción de sideróforos y la actividad ACC desaminasa, eligiéndose las cepas B4, C4, A7 y D7. Posteriormente se realizó un ensayo de microcosmos en plantas de cebada estudiando el efecto PGP *in vivo* a diferentes dosis en ausencia de abono. Los tratamientos inoculados presentaron siempre valores mayores de peso fresco, peso seco, concentración de N en planta y contenido total de N en planta, en comparación con el control sin inocular. La cepa que mejores resultados presentó en peso seco

de la parte aérea ha sido la A7, seleccionada por su actividad ACC desaminasa, y la que mayores valores obtuvo de concentración de nitrógeno fue la C4, seleccionada por producir IAA. En este ensayo también se observó que los mejores resultados se obtuvieron a dosis intermedias de microorganismos.

Respecto a la evaluación del efecto de los fertilizantes recubiertos de rizobios en campo, se observó un claro efecto beneficioso de la inoculación con rizobios sobre el cultivo del trigo y de cebada que, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo, fue constante en todos los ensayos.

Como se ha comentado anteriormente, se realizó una actividad adicional, consistente en el estudio del tipo de simbiosis que se produce entre las raíces de cebada y el rizobio seleccionado, por técnica de microscopía utilizando la GFPo proteína verde fluorescente. Se ha demostrado que en los primeros estadios de desarrollo de las plántulas de cebada la colonización por *Rhizobium leguminosarum* se estableció a nivel rizosférico.

En conjunto, el ensayo en cámara, los ensayos en microcosmos y los ensayos en campo presentan una coherencia en los resultados obtenidos con los tratamientos de fertilizantes recubiertos de rizobios, mejorando la producción de biomasa y de grano en cereales.

Finalmente se ha realizado un análisis económico, en el cual se ha evaluado la repercusión de la utilización de los fertilizantes mejorados en la economía a nivel del agricultor, junto con una evaluación ambiental que ha analizado como dichos fertilizantes pueden reducir la huella de carbono en los cultivos evaluados.

## ABSTRACT

Nowadays scientists study the soil as an ecosystem with continuous transformations and interaction in which microorganisms play an important role. Moreover, recent studies have shown that these microorganisms can improve the absorption of nutrients by plants and therefore enhancing fertilizer use efficiency. As plant nutrition depends on the capacity of soil to supply nutrients in the form, amount and time required by the crops, whenever this circumstance is not met, an external application of mineral fertilizers is needed. In this research, work the effect of using rhizosphere microorganisms in winter cereals has been evaluated to optimize the production of agricultural crops and minimize losses of fertilizer to the environment.

The aim of this study was to analyze the agronomic value of rhizobia combined with the application of mineral fertilizers in extensive cereal crops. The survival of rhizobia on the surface of fertilizer granules was evaluated. In addition, it was also evaluated the effect on the development of wheat plants when using sterile soil in a culture chamber and the effect on plant in microcosm assays using non-sterile soil. The Rhizobium strain was able to survive during the complete duration of the test, despite being in direct contact with fertilizer granules. Results obtained from the culture chamber assay evidenced an improvement in the growth of wheat plants. With regard to the subsequent essay, where wheat was studied under microcosm conditions and using non-sterile soil, it was observed that the application granules coated with rhizobia presented good results for plant nitrogen concentration and a good effect on growth stimulation and biomass production.

The selection of microorganisms was based on their Plant Growth Promoting (PGP) activities, like indoleacetic acid production, solubilization of mineral phosphorus, siderophore production and ACC deaminase activity. Several microorganisms showed different properties, but only B4, C4, A7 and D7 strains were selected. The following test was conducted in microcosm using barley plants in order to select the best in vivo PGP bacteria and compare those results obtained in vitro conditions. This effect was studied at different doses of microorganism in the absence of fertilizer. Results demonstrated that inoculated treatments always reported higher values of fresh and dry biomass, plant N concentration and total content of N in plant when compared with non-inoculated control systems. The strain presenting the best result for dry weight of the aerial part was the A7 which was selected by ACC deaminase activity. On the other hand, the strain C4 presented the best results in plant N concentration and was selected for producing IAA. In this trial, it was also observed that best results were obtained when applying doses of microorganisms of 10<sup>3</sup> and 10<sup>4</sup> UFC/g of soil, with these values corresponding to the medium range of the whole interval tested.

The type of symbiosis between roots of barley and selected microorganism was studied under laboratory conditions by the use of microscopic techniques and green fluorescent protein GFP. Colonization by *Rhizobium leguminosarum* was established at rhizosphere level in the early stages of development of barley. It was also evaluated the effect of these microorganisms on field essays for wheat and barley with the use of rhizobia coated fertilizer. A beneficial effect was present in all field trials, although it was not significant.

Overall, essays performed in culturing chambers, microcosms and field tests show consistency in results obtained when using rhizobia coated fertilizer, demonstrating an improvement in cereals biomass and grain production.

Finally, an economic analysis was performed in which the impact of using improved fertilizers in farm economy was evaluated. An environmental assessment was also analyzed with the aim of demonstrating the capacity of these fertilizers for reducing the carbon footprint in crops.

# Contenido

Contenido .....	I
Índice de Tablas.....	VII
Índice de Figuras.....	XIII
<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Importancia del cultivo de los cereales.....	1
1.1.1 Los cereales y su aprovechamiento .....	1
1.1.2 Situación actual de la producción cerealista.....	1
1.1.3 Legislación relativa a la producción de cereales .....	6
1.1.4 El trigo .....	8
1.1.5 La cebada.....	9
1.2 Fertilidad del suelo y nutrición de los cultivos.....	10
1.2.1 Origen de la fertilización del suelo.....	12
1.2.2 Evolución de los nutrientes en el suelo y aporte mediante fertilización .....	14
1.2.3 Técnicas de aplicación.....	19
1.2.4 Situación actual de los fertilizantes y legislación .....	20
1.3 Interacción planta-microorganismo y su papel en la nutrición de los cultivos.....	22
1.3.1 La rizosfera .....	22
1.3.2 Interacción planta-microorganismo.....	23
1.3.3 Interacciones positivas. Bacterias PGPR.....	25
1.3.3.1 Mejora de la nutrición de las plantas.....	26
1.3.3.2 Estimulación del crecimiento .....	28
1.3.3.3 Superación de situaciones de estrés .....	29
1.3.3.4 Agentes de biocontrol .....	30
1.3.3.5 <i>Rhizobium</i> como PGPR .....	33

## Índice

1.4	Los biofertilizantes .....	37
1.5	Integración de los fertilizantes minerales con los microorganismos beneficiosos de la rizosfera.....	38
1.6	Huella de carbono en los cultivos de cereales .....	40
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>49</b>
3.1	Estudio previo de viabilidad .....	51
3.1.1	Microcosmos en suelo estéril.....	51
3.1.1.1	Diseño experimental del ensayo en cámara de cultivo .....	51
3.1.1.2	Tratamientos evaluados en ensayo en cámara de cultivo .....	52
3.1.1.3	Recopilación de datos en el ensayo de cámara .....	54
3.1.1.4	Resumen de actividades del ensayo en cámara.....	55
3.1.2	Microcosmos en suelo real con plantas de trigo .....	55
3.1.2.1	Diseño experimental del ensayo en microcosmos sobre plantas de trigo .....	55
3.1.2.2	Tratamientos evaluados en microcosmos sobre plantas de trigo .....	56
3.1.2.3	Recopilación de datos en el ensayo en microcosmos sobre plantas de trigo.....	57
3.1.2.4	Resumen de actividades del experimento en microcosmos.....	58
3.2	Pruebas PGP <i>in vitro</i> .....	59
3.2.1	Microorganismos utilizados en el estudio.....	59
3.2.2	Prueba de solubilización de fósforo .....	60
3.2.3	Producción de ácido indolacético (IAA) .....	60
3.2.4	Producción de sideróforos .....	62
3.2.5	Actividad ACC desaminasa .....	64
3.3	Microcosmos en plantas de cebada.....	65
3.3.1	Diseño experimental .....	65
3.3.2	Tratamientos evaluados.....	67

3.3.3	Resumen de actividades del experimento en microcosmos.....	69
3.4	Nivel de interacción entre rizobios y raíces .....	70
3.4.1	Material microbiano.....	70
3.4.2	Medios de cultivo .....	71
3.4.3	Transferencia de ADN del plásmido mediante conjugación biparental.....	72
3.4.4	Aislamiento del <i>Rhizobium</i> transformado.....	73
3.4.5	Inoculación de raíces de cebada y observación al microscopio.....	73
3.4.6	Aislamiento de posibles endófitos del interior de la raíz, extracción de ADN y comparación de su perfil RAPD con la bacteria inoculada.....	75
3.4.6.1	Extracción y purificación del ADN .....	75
3.4.6.2	Amplificación del ADN para obtener perfiles de RAPD.....	76
3.5	Ensayos en campo.....	77
3.5.1	Genotipos .....	77
3.5.2	Diseño experimental de los ensayos de campo .....	78
3.5.3	Descripción de los ambientes.....	78
3.5.4	Tratamientos evaluados en los ensayos de campo.....	80
3.5.5	Resumen de actividades de los ensayos de campo .....	81
3.5.6	Operaciones de cultivo.....	81
3.6	Evaluación económica y ambiental.....	83
3.7	Técnicas analíticas.....	85
3.7.1	Análisis de material vegetal .....	85
3.7.2	Análisis de suelo .....	86
3.8	Análisis estadísticos.....	86
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>87</b>
4.1	Supervivencia y efecto en planta de los rizobios cuando se aplican al abono o a la semilla en microcosmos.....	89
4.1.1	Supervivencia .....	89

## Índice

4.1.2	Efecto en planta en suelo estéril.....	90
4.1.3	Efecto en planta en suelo real.....	92
4.1.3.1	Contenido de N, P, K, Ca y Mg en la biomasa, 70 días de la siembra. ....	92
4.1.3.2	Análisis de los parámetros vegetativos a los 95 días de la siembra.....	94
4.1.4	Análisis comparativo de los resultados en suelo esterilizado y sin esterilizar para el tratamiento control fertilizado 15-35-0+Zn y los tratamientos inoculados.....	95
4.2	Pruebas PGP (Plant Growth Promoting) “in vitro” para las cepas de rizobios.....	96
4.2.1	Solubilización de P.....	96
4.2.2	Producción de ácido indolacético .....	97
4.2.3	Producción de sideróforos. ....	98
4.2.4	Actividad ACC desaminasa. ....	99
4.2.5	Resumen de pruebas PGP .....	100
4.3	Efecto en planta en microcosmos de los rizobios seleccionados. Determinación de la dosis óptima. ....	101
4.3.1	Parámetros de crecimiento al final del ahijado .....	101
4.3.2	Parámetros de crecimiento y rendimiento al final del ciclo productivo.....	107
4.4	Nivel de interacción entre rizobios y raíz.....	111
4.4.1	Observación al microscopio óptico .....	111
4.4.2	Aislamiento e identificación de endófitos.....	112
4.5	Evaluación en campo de los fertilizantes mejorados con rizobios en cultivos de trigo y cebada <sup>114</sup>	
4.6	Evaluación económica.....	121
4.7	Evaluación ambiental .....	124
<b>5</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>127</b>
5.1	Supervivencia de los rizobios cuando se aplican sobre el abono .....	129
5.2	Propiedades PGP (Plant Growth Promoting) <i>in vitro</i> y su posible influencia en el desarrollo de los cultivos.....	131
5.2.1	Solubilización de fósforo .....	132



5.2.2	Producción de Ácido Indolacético.....	132
5.2.3	Producción de sideróforos .....	133
5.2.4	Actividad ACC desaminasa .....	133
5.2.5	Otros mecanismos de acción de las PGPR .....	134
5.3	Efecto de los rizobios en planta a nivel de microcosmos.....	135
5.3.1	Efecto de la dosis de rizobios .....	136
5.3.2	Producción de biomasa y rendimiento .....	137
5.3.3	Contenido en nutrientes .....	139
5.3.3.1	El nitrógeno .....	139
5.3.3.2	El fósforo .....	142
5.3.3.3	Otros nutrientes .....	145
5.4	Interacción entre rizobios y raíz.....	146
5.5	Efecto de los fertilizantes mejorados con rizobios en campo.....	148
5.5.1	Ensayo de cebada variedad <i>Publican</i> (Beja, Portugal) .....	149
5.5.2	Ensayo de trigo variedad <i>Core</i> (Berengenilla, Sevilla).....	149
5.5.3	Ensayo de trigo variedad <i>Avispa</i> (Rancho Paulo, Sevilla).....	150
5.5.4	Ensayo de trigo variedad <i>Artur Nick</i> (Algarabejo, Sevilla).....	151
5.5.5	Análisis conjunto ensayos de cámara, microcosmos y campo.....	152
5.6	Estudio económico y ambiental de las soluciones propuestas.....	153
<b>6</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>159</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>163</b>



**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Superficie y producción de cereales en España (MAGRAMA 2013).....	5
Tabla 2. Comercio exterior de cereales (excluido el arroz) (MAGRAMA 2011).....	5
Tabla 3. Evolución del consumo de productos fertilizantes en España. Datos en % (Domínguez. 1990). .....	14
Tabla 4. Principales fertilizantes nitrogenados (España. 2013). .....	16
Tabla 5. Clasificación de los fertilizantes fosfatados (España. 2013). .....	17
Tabla 6. Exudados radiculares producidos por las raíces de las plantas y liberados a la rizosfera. ....	23
Tabla 7. Producción de fitohormonas por PGPR (Modificado de García Fraile <i>et al.</i> 2012). .....	29
Tabla 8. Rizobios PGPR en no leguminosas (Modificado de García-Fraile <i>et al.</i> 2012).....	35
Tabla 9. Investigaciones de Rizobios en diferentes cultivos y principales acciones: la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) o la Estimulación del Crecimiento (PGPR). .....	36
Tabla 10. Análisis del suelo utilizado en el ensayo de cámara de cultivo, después de la esterilización. ....	52
Tabla 11. Tratamientos realizados en el ensayo sobre suelo esterilizado.....	53
Tabla 12. Composición del medio YMA (izquierda) y TSA (derecha). .....	53
Tabla 13. Análisis del sustrato suelo/vermiculita utilizado en el ensayo de microcosmos. ....	56
Tabla 14. Tratamientos realizados en el ensayo de microcosmos en invernadero. ....	57
Tabla 15. Colección de cepas de rizobios utilizadas en la investigación (Mulas 2010).....	59
Tabla 16. Composición del medio YED-P.....	60
Tabla 17. Composición del medio JMM modificado y composición de la solución de vitaminas. ....	61
Tabla 18. Solución 2 del M9-CAS-Agar. ....	63
Tabla 19. Solución 3 del M9-CAS-Agar. ....	63
Tabla 20. Descripción del Medio Mínimo DF Sales. ....	64

## Índice de Tablas

Tabla 21. Análisis del suelo utilizado para los ensayos de microcosmos.....	66
Tabla 22. Cepas seleccionadas en el ensayo y descripción de las razones de selección. ....	67
Tabla 23. Justificación de la dosis de bacterias utilizada en el ensayo de microcosmos para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones. ....	68
Tabla 24. Tratamientos del ensayo de microcosmos.....	69
Tabla 25. Composición del medio TY (izquierda) y LB (derecha). ....	71
Tabla 26. Composición del medio mínimo para <i>Rhizobium</i> (O'Hara y Shanmugam, 1976) modificado. ....	72
Tabla 27. Composición medio Violet Red Agar, VRA (Davis 1951).....	72
Tabla 28. Composición de la mezcla de reacción y condiciones de la PCR para la obtención del RAPD.....	76
Tabla 29. Ubicación de los ensayos de campo.....	78
Tabla 30. Análisis del suelo utilizado para los ensayos de campo. ....	78
Tabla 31. Tratamientos de los ensayos de campo. ....	81
Tabla 32. Tipos y dosis de abono aplicados en los abonados de cobertera. ....	81
Tabla 33. Datos de los cultivos en los ensayos en campo.....	83
Tabla 34. Precios de los fertilizantes y del grano de cereal en España durante la campaña 2013/2014. (Datos del MAGRAMA) .....	83
Tabla 35. Emisiones fijas del cultivo del cereal (Altuna <i>et al.</i> 2011) .....	84
Tabla 36. Valores fijos para el cálculo de emisiones de CO <sub>2</sub> equivalentes de los fertilizantes. ..	84
Tabla 37. Resultados del número más probable (NMP) de rizobios en el suelo, al final del experimento, para suelo inicialmente esterilizado.....	90
Tabla 38. ANOVA de las variables dependientes biomasa aérea y altura de la planta, en el ensayo sobre suelo estéril.....	90
Tabla 39. Prueba post-hoc para la variable dependiente biomasa aérea seca y altura de la planta (Diferencia Mínima Significativa respectivamente $p < 0,05$ ). .....	91

Tabla 40. ANOVA de las variables dependiente contenido de N, Mg, Ca, P y K en la biomasa para el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 70 días después de la siembra.....	92
Tabla 41. Valores medios de la concentración de elementos en la biomasa seca, en el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 70 días después de la siembra.....	92
Tabla 42. Valores medios del contenido total de nutrientes en la biomasa de la planta, en el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 70 días después de la siembra. ....	93
Tabla 43. ANOVA de las variables dependientes biomasa fresca y seca, en el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 95 días después de la siembra.....	94
Tabla 44. Prueba post-hoc para los valores medios de la variable dependiente biomasa fresca y biomasa seca 95 días después de la siembra (Diferencia Mínima Significativa respectivamente $p < 0,05$ ). Los datos están ordenados de menor a mayor biomasa seca.....	94
Tabla 45. Conclusiones de la comparación entre los resultados obtenidos en el control fertilizado 15-35-0+Zn y el tratamiento del mismo abono recubierto con los microorganismos individualmente y mezclados.....	95
Tabla 46. Producción de IAA para las cepas incluidas en el estudio. Valores medios de tres determinaciones por cepa. ....	97
Tabla 47. Actividad ACC desaminasa. Valores medios de crecimiento bacteriano en los medios indicados. Los valores son medias de tres determinaciones por cepa.....	99
Tabla 48. Resultados de las distintas pruebas PGPR realizadas.....	100
Tabla 49. ANOVA respecto de la variable independiente “cepa inoculada”, correspondiente al muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos (g.l: grados de libertad, mc: media cuadrática, F: estadístico F).....	102
Tabla 50. Valores medios por planta de diferentes parámetros de crecimiento en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “cepa inoculada”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de peso seco. ....	102
Tabla 51 . Valores de la concentración de nutrientes en la biomasa aérea en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “cepa inoculada”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas	

están ordenadas por valores crecientes de concentración de nitrógeno en la biomasa aérea.  
..... 103

Tabla 52. Valores medios del contenido total de diferentes nutrientes en la biomasa aérea por planta en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “cepa inoculada”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de nitrógeno total por planta. .... 103

Tabla 53. Valores medios de diferentes parámetros de crecimiento en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de peso fresco..... 104

Tabla 54. Valores de la concentración de nutrientes en la biomasa aérea en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las dosis están ordenadas por valores crecientes de concentración de nitrógeno en la biomasa aérea..... 104

Tabla 55. Valores medios del contenido total de diferentes nutrientes en la biomasa aérea por planta en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de nitrógeno total por planta. .... 105

Tabla 56. Valores medios de diferentes parámetros de crecimiento y del contenido total de diferentes nutrientes en la biomasa aérea por planta, en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de las variables independientes “cepa inoculada” y “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de peso fresco. .... 106

Tabla 57. ANOVA respecto de la variable independiente “cepa inoculada”, correspondiente al muestreo final en el momento de la cosecha para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones..... 107

Tabla 58. Valores medios de diferentes parámetros en el ensayo de microcosmos, correspondientes al muestreo final en el momento de la cosecha, respecto de la variable independiente “cepa inoculada”. Los valores seguidos de la misma no difieren significativamente (prueba LSD  $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de rendimiento..... 108

Tabla 59. ANOVA respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”, correspondiente al muestreo final en el momento de la cosecha para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones.....	108
Tabla 60. Valores medios de diferentes parámetros en el ensayo de microcosmos, correspondientes al muestreo final en el momento de la cosecha, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de rendimiento.....	108
Tabla 61. ANOVA combinado de las dos variables independientes “cepa inoculada” y “dosis de microorganismos” correspondiente al muestreo final en el momento de la cosecha, para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones.....	109
Tabla 62. Valores medios de diferentes parámetros en el ensayo de microcosmos, correspondientes al muestreo final en el momento de la cosecha, respecto de las variables independientes “cepa inoculada” y “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). .....	110
Tabla 63. Análisis de suelo tras la cosecha de la cebada en el ensayo de microcosmos.....	110
Tabla 64 ANOVA conjunto de todos los parámetros analizados, para las fuentes de variación genotipo, tratamiento e interacción entre ambos (valor de significación * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ). .....	115
Tabla 65. Valores medios por tratamiento para el genotipo de cebada “Publican” en el ensayo de campo en Beja, de las diferentes variables dependientes. Se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$ .....	116
Tabla 66. Valores medios por tratamiento para el genotipo de trigo “Core” en el ensayo de campo en Berengenilla, de las diferentes variables dependientes. Se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para $p < 0,05$ .....	117
Tabla 67. Valores medios por tratamiento para el genotipo de trigo “Avispa” en el ensayo de campo en Rancho Paulo, de las diferentes variables dependientes. Se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor	

## Índice de Tablas

de significación \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para  $p < 0,05$ ..... 117

Tabla 68. Valores medios por tratamiento para el genotipo de trigo “Artur Nick” en el ensayo de campo en Algarabejo, de las diferentes variables dependientes. Se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para  $p < 0,05$ ..... 119

Tabla 69. Tabla resumen de los distintos ensayos de campo ordenados de mayor a menor rendimiento en grano. Los tratamientos con microorganismos fueron diseñados con el 80 % de la fertilización recomendada..... 120

Tabla 70. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo cebada V. *Publican*..... 122

Tabla 71. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo trigo duro V. *Core*..... 122

Tabla 72. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo trigo duro V. *Avispa*. ..... 123

Tabla 73. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo trigo blando V. *Arthur Nick*. ..... 123

Tabla 74. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de cebada *Publican*. ..... 125

Tabla 75. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de trigo duro *Core*. ..... 125

Tabla 76. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de trigo duro *Avispa*..... 126

Tabla 77. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de trigo blando *Arthur Nick*. ..... 126



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de cereales (Mt) FAO 2013.....	2
Figura 2. Rendimiento medio de cereales (Mueller <i>et al.</i> 2012). ....	2
Figura 3. Producción de trigo (gráfico parte superior) y cebada (gráfico parte inferior) a nivel mundial en el 2013 (MT) (FAOSTAT. 2014).....	3
Figura 4. Producción de trigo (izquierda) y cebada (derecha) en la Unión Europea (MT). (EUROSTAT. 2014).....	4
Figura 5. Porcentajes de superficie cultivada en España de los diferentes cereales.....	6
Figura 6. Clasificación del trigo <i>Triticum aestivum</i> .....	8
Figura 7. Clasificación de la cebada <i>Hordeum vulgare</i> (A), <i>H. distichon</i> (B) y <i>H. hexastichon</i> (C). ....	10
Figura 8. Aplicaciones medias de fertilizantes nitrogenados (Kg N / ha) (Mueller <i>et al.</i> 2012)...	11
Figura 9. Contenido en fósforo asimilable de los suelos españoles (INIA 2009). ....	18
Figura 10. Importancia de los microorganismos en el suelo (Castro Pinto. 2011). ....	22
Figura 11. Esquema de las principales acciones de las bacterias PGPR.....	26
Figura 12. Movilización e inmovilización del fósforo en el suelo por las rizobacterias (Modificado Behera <i>et al.</i> 2013).....	27
Figura 13. Actividad enzimática ACC desaminasa (Modificado Kang <i>et al.</i> 2010). ....	30
Figura 14. Principales mecanismos de defensa en plantas.....	31
Figura 15. Clasificación de la cepa tipo del género <i>Rhizobium</i> y su imagen al microscopio electrónico.....	33
Figura 16. Importancia de la combinación de los fertilizantes minerales con PGPR para mejorar la productividad de los cultivos.....	39
Figura 17. Resumen esquemático de los objetivos que han sido desarrollados en este trabajo. ....	45
Figura 18. Esquema explicativo del plan de trabajo llevado a cabo con el fin de cumplir los objetivos planteados.....	46

## Índice de Figuras

Figura 19. Ensayo sobre suelo esterilizado y en cámara de cultivo.....	52
Figura 20. Prueba de recuento de microorganismos en placa Petri tratamiento F-B4 (izquierda), prueba del Número Más Probable (NMP) en cámara de cultivo (centro) y análisis de la supervivencia del rizobio mediante el recuento de nódulos en las raíces de las plantas de alubia (derecha). .....	54
Figura 21. Cronograma del ensayo de supervivencia y efecto de los microorganismos en plantas de trigo, en suelo esterilizado.....	55
Figura 22. Plantas de trigo en el ensayo de microcosmos en invernadero. ....	56
Figura 23. Primeros estados fenológicos analizados, plantas de trigo una vez completada la nascencia (izquierda), la formación de 3 hojas (centro) y pleno ahijado (derecha). .....	58
Figura 24. Cronograma del ensayo del efecto de los microorganismos sobre el desarrollo del trigo en condiciones de microcosmos.....	58
Figura 25. Estructura del triptófano y del ácido inolacético. ....	61
Figura 26. Se observa el cambio de coloración del medio JMM modificado con el agente Salkowski; la intensidad del color rosáceo es indicador de la cantidad de IAA producido. Las muestras corresponden de izquierda a derecha con C3, B4, D2 y A13. ....	62
Figura 27. Prueba de sideróforos (Schwyn y Neilands 1987).....	62
Figura 28. Imágenes de la prueba del ACC, tubos con medio mínimo DF sales (izquierda) y cubetas para medir densidad óptica de las bacterias crecidas en presencia de ACC (derecha). 64	64
Figura 29. Ensayo de microcosmos para la evaluación de la inoculación de microorganismos sobre plantas de cebada. ....	66
Figura 30. Inoculación de los microorganismos sobre las semillas de cebada. ....	69
Figura 31. Cronograma del ensayo de evaluación de las bacterias con mayor actividad PGP in vivo sobre plantas de cebada, optimizando la dosis de bacterias en microcosmos.....	70
Figura 32. Plásmido pHCG60 con los puntos de corte de las principales enzimas de restricción. 71	71
Figura 33. Pasos en el marcaje de <i>Rhizobium</i> sp. con GFP. La imagen A muestra el proceso de trasconjugación, B y C muestran el crecimiento de los transconjugantes para separarlos de <i>E. coli</i> . ....	73

Figura 34. Semillas de cebada pregerminadas inoculadas con la cepa B4 de Rhizobium y trasferidas a las placas Petri (A), semillas sumergidas en caldo de cultivo en la segunda prueba (B) y plántulas con 10 días en la tercera prueba (C). .....	74
Figura 35. Gráfico de datos climáticos del ensayo de Sevilla de las parcelas de Berengenilla y Rancho Paulo (superior), de Beja en Portugal (medio) y Algarabejo (inferior) datos proporcionados por AIMCRA, ADP Fertilizantes y la Escuela Superior Agraria de Beja. ....	79
Figura 36. Cronogramas de los ensayos de campo. Principales actividades realizadas en los ensayos de campo.....	82
Figura 37. Procesado de las muestras de biomasa aérea de trigo, plantas preparadas para el secado (izquierda) y muestra tras el triturado (derecha). .....	85
Figura 38. Observación del crecimiento de colonias microbianas en placas con medio YMA, inoculadas con diluciones decimales $10^{-1}$ (A), $10^{-2}$ (B), $10^{-3}$ (C) y $10^{-4}$ (D) de suelo previamente esterilizado, al final del experimento. El tratamiento seleccionado para la figura fue Fertilizante recubierto con B4.....	89
Figura 39. Placa Petri de medio YED-P con cepas de Rhizobium que presentaron resultados negativos (izquierda) y una de las dos cepas que dieron positivo en la solubilización de fosfato (derecha). .....	96
Figura 40. Coloración obtenida en la producción de IAA por las distintas cepas debido al reactivo Salkowsky. ....	98
Figura 41. Prueba de producción de sideróforos. Se observan dos bacterias (C4 y LET1903) que producen sideróforos y dieron positivo en la prueba; también se observa el rizobio central que dio negativo (D10). .....	98
Figura 42. Final del ciclo de la cebada en el ensayo de microcosmos. ....	107
Figura 43. Observaciones con microscopía confocal de los resultados de las distintas pruebas, A) Primera prueba en la que las raíces de cada plántula fueron inoculadas con 250 $\mu$ L del cultivo puro de la bacteria. B) Observación de la segunda prueba, las raíces de cada plántula fueron sumergidas durante 30 minutos en el cultivo puro de la bacteria transformada. C) y D) Tercera prueba, en la que las raíces de cada plántula fueron sumergidas durante 3 horas en el cultivo puro de la bacteria transformada. ....	111
Figura 44. A) Colonias formadas por microorganismos endofíticos de raíces de cebada obtenidas en condiciones de esterilidad, que habían sido inoculadas por inmersión durante 3 horas en el cultivo puro del rizobio transformado (tercera prueba). Las raíces antes del recuento fueron	

## Índice de Figuras

esterilizadas superficialmente en etanol al 70% durante 1 minuto seguido de 5 minutos en NaClO al 5%. B) Patrón de bandas con el RAPD M13 correspondiente al rizobio inoculado y a los 3 aislados del interior de la raíz con morfología de la colonia más similar a la del género Rhizobium. ....	113
Figura 45. Ensayos de trigo en Berengenilla (A) y Rancho Paulo (B), ensayo de cebada en Beja (C) y de trigo en Algarabejo (D). ....	114
Figura 46. Gráfico de rendimientos global para los cultivos estudiados. ....	120

# **1 Introducción**



## **1.1 Importancia del cultivo de los cereales**

### **1.1.1 Los cereales y su aprovechamiento**

Durante la Revolución Neolítica, los primeros agricultores empezaron a domesticar los cultivos, incidiendo en la evolución de las plantas (Remigereau *et al.* 2011). Por este motivo, la evolución del hombre se encuentra ligada al desarrollo de las adaptaciones genéticas de las plantas (Fuller *et al.* 2010).

Desde el inicio de la civilización, los cereales constituyen el principal alimento del hombre debido a su gran aporte energético y a su elevado contenido en nutrientes. Los cereales son plantas herbáceas pertenecientes a la familia de las poáceas o gramíneas.

Los cereales presentan una gran adaptación a diferentes zonas geográficas. Por ejemplo, el sorgo y el mijo están adaptados a condiciones semiáridas, el arroz a climas muy cálidos y a crecer bajo el agua, mientras que la avena y el centeno pueden desarrollarse en climas muy fríos (Dendy. 2003). Por otra parte, los denominados cereales de invierno, se han adaptado a zonas con una estación de crecimiento fresca y húmeda seguida de otra cálida y seca en la maduración. En concreto, el trigo requiere de temperaturas no muy frías, escasez de lluvia en invierno y abundancia en primavera. El centeno y la avena, son especialmente resistentes a condiciones climatológicas adversas y a suelos pobres, en consecuencia, se han adaptado a climas más húmedos y extremos de Europa Central. La cebada se desarrolla de manera favorable en las áreas con lluvias primaverales escasas, ya que tolera mejor el estrés hídrico del final del ciclo del cultivo. Sin embargo, el maíz requiere un buen suministro de agua y temperaturas suaves para el desarrollo de su ciclo vegetativo (MAGRAMA. 2012).

Los cereales son la mayor fuente de carbohidratos para los seres humanos y también para los animales domésticos, por lo tanto constituyen la base de la alimentación, si bien el tipo de cereal mayoritario depende de la región del mundo. En Europa tuvo lugar un mayor desarrollo del trigo y la cebada, mientras que el arroz se convirtió en el alimento esencial en los pueblos asiáticos. El sorgo y el mijo tuvieron más desarrollo en el continente africano. En Centro y Sudamérica, el principal cereal cultivado es el maíz, alimento esencial y más abundante (Serna. 1996).

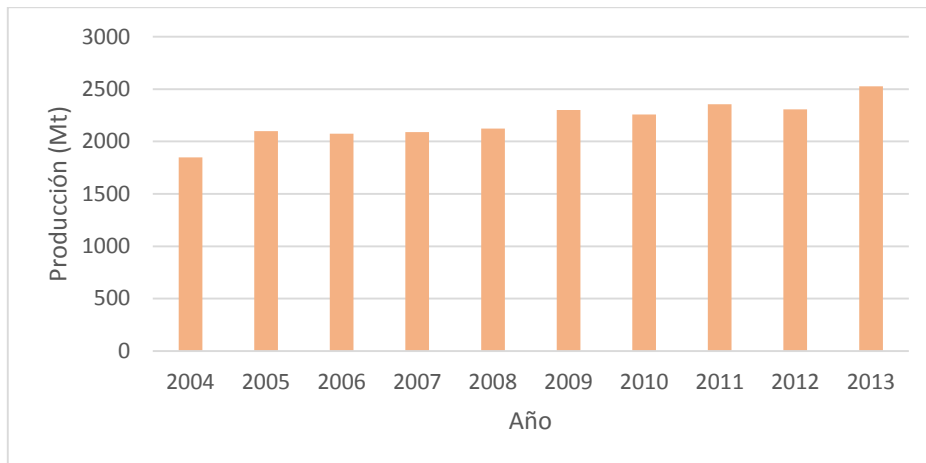
### **1.1.2 Situación actual de la producción cerealista**

Desde hace unas décadas se está produciendo un aumento de la población mundial. Para evitar su malnutrición, es necesario que dicho aumento se acompañe de una mayor producción de alimentos (FAO. 2013). Simultáneamente se está produciendo un incremento del consumo de

## Introducción

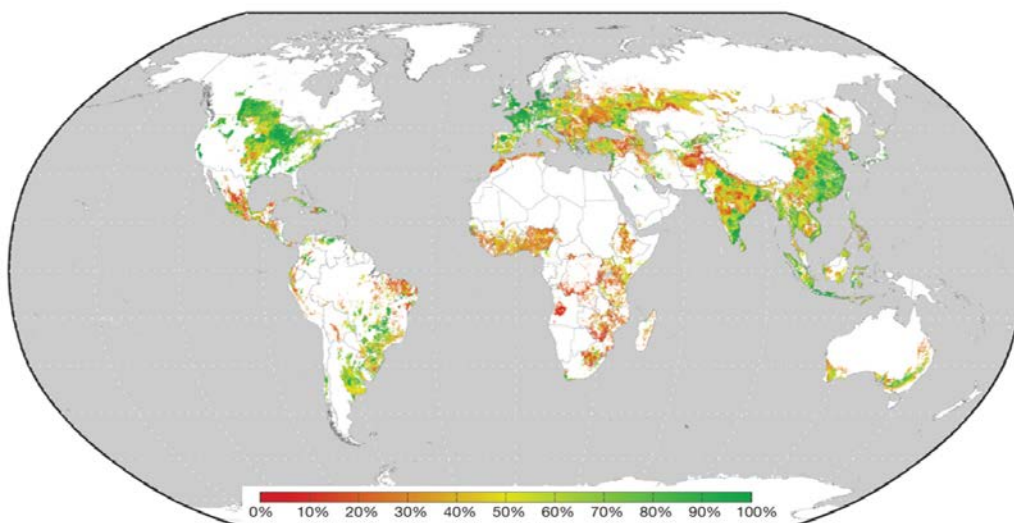
carne en la población, lo cual se traduce en una mayor demanda de cereales para la elaboración de piensos destinados a la alimentación animal.

El aumento de la producción de cereales en los últimos años (Figura 1), ha sido posible debido al incremento de la superficie cultivada y a la mejora de los sistemas de producción agraria, englobando el desarrollo biotecnológico de los cultivos, la optimización de la maquinaria agrícola y la utilización de fertilizantes minerales.



**Figura 1. Producción mundial de cereales (Mt) FAO 2013.**

En el año 2013, la producción mundial de cereales ha sido de 2.525,7 millones de toneladas. En concreto, la producción de trigo ha alcanzado 704 millones de toneladas, colocándose en el nivel más alto de la historia. La producción mundial de cereales secundarios, donde se incluye la cebada, ha llegado a 1.275 millones de toneladas. Durante el 2013 se ha producido un aumento de la producción respecto al 2012, en el caso del trigo dicho aumento fue del 7.8 %, en los cereales secundarios alcanzó el 12 % y en el arroz fue tan sólo del 1 % (FAO. 2013).



**Figura 2. Rendimiento medio de cereales (Mueller et al.2012).**





## Introducción

en conjunto el 90 % del total de cereales, mientras que el resto pertenece a la producción de avena, centeno y sorgo.

La producción cerealista se distribuye como dos terceras partes para alimentación animal y una tercera parte para consumo humano, mientras que para la elaboración de biocombustibles tan sólo se destina un 3 %. La producción de trigo ha sufrido dos leves descensos entre el 2008-2010 y entre el 2011-2013 en los últimos 6 años (Figura 4, izquierda). La producción de cebada en Unión Europea se mantiene relativamente constante con ligeras oscilaciones (Figura 4, derecha).



Figura 4. Producción de trigo (izquierda) y cebada (derecha) en la Unión Europea (MT). (EUROSTAT. 2014).

En **España**, la producción total de cereales presentó un máximo histórico en 2007 y 2008, en los años posteriores se estabilizó (Tabla 1). Los rendimientos de los cereales de invierno, por ser cultivados mayoritariamente en secano, están ligados a las condiciones meteorológicas benignas en 2007 y muy desfavorables en 2009. Por esta razón en 2007 hubo una producción record seguida de una gran bajada en 2009, año en el que también se redujo notablemente la superficie cultivada. El trigo y la cebada siguieron esta misma tendencia general; sin embargo su importancia respecto al global de los cereales producidos varía según el año.

El trigo ha representado entre el 29 - 33 % de la superficie total de los cereales y entre el 32 - 40 % de la producción de cereales de invierno. Los mejores años de producción de trigo en España han sido el 2008 y el 2011 llegando en ambos casos a producir cerca de 7 millones de toneladas.

La superficie de cebada cultivada en nuestro país ha variado constituyendo, según el año, desde el 45 - 53 % del total de cereales, y la producción ha supuesto entre el 50 - 60 % del total de cereales de invierno. La producción de cebada tuvo su mayor importancia en el año 2007 situándose muy cerca de las 12 millones de toneladas, y presenta su mínimo en el 2009 con una producción de 7 millones de toneladas.

Tabla 1. Superficie y producción de cereales en España (MAGRAMA 2014).

	2007			2008			2009			2010			2011			2012		
	Sup. (x1.000ha)	Prod. (x1.000t)	Rto. (t/ha)	Sup. (x1.000ha)	Prod. (x1.000t)	Rto. (t/ha)	Sup. (x1.000ha)	Prod. (x1.000t)	Rto. (t/ha)	Sup. (x1.000ha)	Prod. (x1.000t)	Rto. (t/ha)	Sup. (x1.000ha)	Prod. (x1.000t)	Rto. (t/ha)	Sup. (x1.000ha)	Prod. (x1.000t)	Rto. (t/ha)
<b>Trigo total</b>	1.803,3	6.436,3	3,6	2.057,9	6.831,4	3,3	1.772,8	4.804,8	2,7	1.935,4	5.836,4	3,0	1.992,7	6.900,2	3,5	1.912,4	6.161,8	3,2
<b>Cebada total</b>	3.228,4	11.945,4	3,7	3.497,0	11.269,7	3,2	3.024,8	7.295,9	2,4	2.871,9	8.150,6	2,6	2.697,9	8.328,1	3,1	3.062,0	9.397,9	3,1
<b>Avena</b>	531,4	1.309,9	2,5	505,5	1.188,3	2,4	561,2	923,9	1,6	538,6	1.017,3	1,9	419,3	1.078,7	2,2	525,6	1.103,6	2,1
<b>Centeno</b>	111,7	261,4	2,3	111,5	283,2	2,5	132,2	180,7	1,4	135,8	274,7	2	148,8	366,7	2,5	128	273,3	2,1
<b>Triticale</b>	47,4	133,8	2,8	54,5	136,2	2,5	61	138,5	2,3	63,9	138,7	2,2	82	205,6	2,5	61,8	150,6	2,4
<b>Total cereales invierno</b>	5.722,2	20.086,8	3,5	6.216,4	19.708,8	3,2	5.552,0	13.343,8	2,4	5.545,6	15.417,7	2,8	5.412,7	16.879,3	3,1	5.689,8	17.087,3	3,0
<b>Maíz</b>	361	3.610,9	10	371,9	3.718,0	10	348,9	3.515,6	10,1	311,9	3.293,7	10,6	368,3	3.855,8	10,5	352,4	5.598,8	10,2
<b>Sorgo</b>	7,1	26,2	3,7	6,8	22,4	3,3	7,5	32,8	4,4	7,3	32,6	4,5	9,6	39,1	4,5	7,5	30,6	4,1
<b>Arroz</b>	101,6	723,4	7,1	95,5	635,7	6,7	119,2	913,8	7,7	122,5	926,4	7,6	121,7	929,9	7,6	112,1	825,8	7,4
<b>Total de cereales primavera</b>	649,7	4.306,	9,3	474,2	4.376,1	9,2	475,6	4.462,2	9,4	441,7	4.252,7	9,6	498,6	4.824,8	9,7	474	4.455,3	9,4
<b>Total de cereales</b>	<b>6.191,9</b>	<b>24.447,3</b>	<b>3,9</b>	<b>6.690,6</b>	<b>24.084,9</b>	<b>3,6</b>	<b>6.027,6</b>	<b>17.806,0</b>	<b>3,0</b>	<b>5.987,3</b>	<b>19.670,4</b>	<b>3,3</b>	<b>5.911,3</b>	<b>21.704,1</b>	<b>3,7</b>	<b>6.161,7</b>	<b>21.542,5</b>	<b>3,5</b>

Tabla 2. Comercio exterior de cereales (excluido el arroz) (MAGRAMA 2011).

Campaña de comercialización 2010/2011								
Ud. 1000 Toneladas	Trigo	Cebada	Maíz	Centeno	Avena	Sorgo	Triticale	TOTAL
<b>Importaciones (x1000t)</b>	3.866,83	917,749	5.141,58	24,027	16.119	708,155	29,454	10.703,92
<b>UE</b>	3.393,75	857,324	2.457,66	23,998	15.677	30,158	29,391	6.807,95
<b>Terceros</b>	473,09	60,425	2.683,92	29	442	677,997	63	3.895,97
<b>Exportaciones (x1000t)</b>	1.216,78	242,441	430,30	10,726	802	11,322	27,07	1.949,44
<b>UE</b>	961,65	119,299	387,08	10,265	763	11,281	26,948	1.517,28
<b>Terceros</b>	265,13	123,142	43,22	461	39	41	122	432,16

## Introducción

El siguiente gráfico (Figura 5) muestra los porcentajes medios de superficie obtenidos de los 6 años estudiados en la tabla 1 destinados a los diferentes cultivos en nuestro país. Se observa que la cebada y el trigo juntos suponen más del 80 % del total de superficie cultivada, mientras que el resto de cereales en conjunto no llegan al 20 %.

Estos datos de producción nacional se completan con los aportados de comercio exterior para cada año, la tabla 2 se refiere al año 2011.

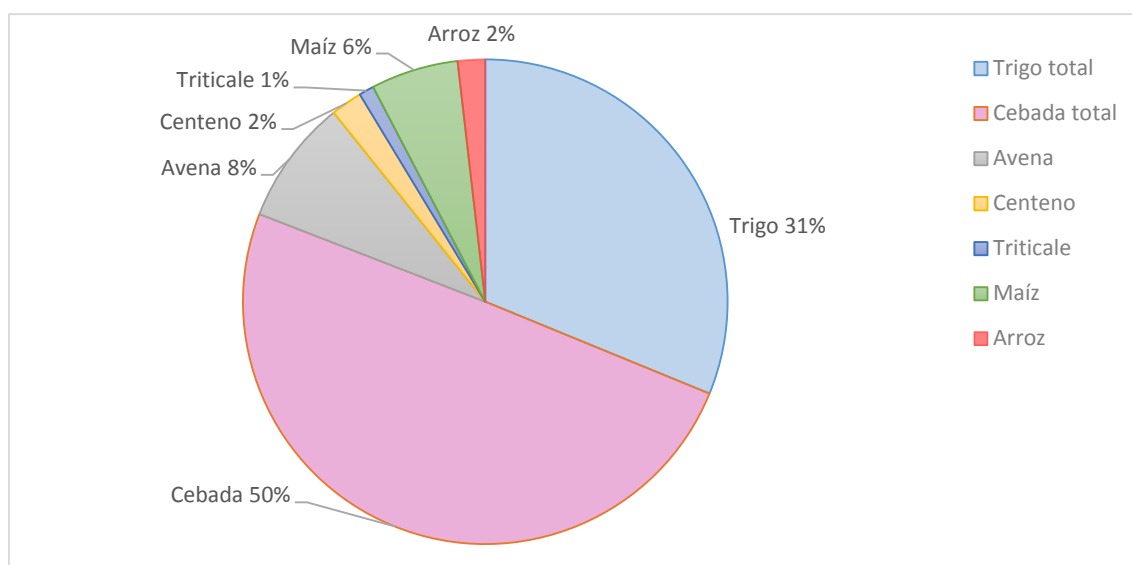


Figura 5. Porcentajes de superficie cultivada en España de los diferentes cereales.

Las importaciones de cebada suponen el 9 % del total de cereales, del cual el 93 % provienen de la Unión Europea. Las exportaciones suponen el 12 %, del cual el 50 % hacia la Unión Europea y el resto hacia terceros países.

Las importaciones de trigo ascienden hasta un 36 % del total, del cual el 88 % procede de la Unión Europea, y las exportaciones de trigo suponen muchísimo más que en el caso de la cebada, un 62 % del total de cereales, del cual cerca del 80 % fue hacia la Unión Europea y el resto hacia terceros países.

### 1.1.3 Legislación relativa a la producción de cereales

Desde la adhesión de España a la UE en 1986, las perspectivas de futuro en la agricultura española siguen la dirección de Europa. Los gobiernos de los Estados Miembros definen la Política Agraria Común (PAC) y son los encargados de aplicarla. Se considera una de las políticas más importantes dentro de la Unión Europea debido a que comenzó absorbiendo 2/3 del presupuesto comunitario y supuso una importante cesión de soberanía de los diferentes Estados Miembros hacia las instituciones europeas.

La PAC está compuesta por normas y mecanismos que regulan la producción, el comercio y el tratamiento de los productos agrícolas en la Unión Europea. La Organización Común de Mercado (OCM) de los cereales fue una de las primeras establecidas en la Comunidad Económica Europea en la década de los setenta y sufrió sucesivas modificaciones. En el año 2003 se establecieron medidas para el control del sistema de intervención pública, como consecuencia de la aplicación de la Reforma de la PAC del 2003 (Europa. 2003).

Posteriormente, en el 2007 se sustituyen las OCM sectoriales por una OCM única (Europa. 2007). Los productos regulados por esta OCM fueron los cereales excepto el arroz, y los productos derivados de los mismos. En este período existe un régimen de intervención para su compra por los Estados Miembros. En España este organismo de intervención es el Fondo Español de Garantía Agraria (FEGA).

Los derechos de importación en el sector de los cereales presentaban una gran problemática debido a la heterogeneidad de los productos agrícolas, por lo que fue necesario establecer disposiciones específicas (Europa. 2010).

A partir de 2009 las ayudas destinadas a los agricultores se establecieron en un Régimen de Pago Único que suprimía el vínculo entre producción y ayuda, por lo tanto se instauró un pago desacoplado que establecía pagos directos a los agricultores titulares de derechos de ayuda. Dichos derechos se calcularon en función de las ayudas directas durante un periodo de referencia histórico y en función de la superficie que dio lugar a dichas ayudas (Europa. 2009).

La estrategia Europa 2020 está basada en tres pilares fundamentales: sostenibilidad económica, medioambiental y social. Esta estrategia determinará las reformas de la PAC a partir de 2014. Las subvenciones a la agricultura que respeten el medio ambiente y la biodiversidad estarán legitimadas por el “*greening*”. Estas prácticas deben de ir adaptadas a las peculiaridades de los diferentes países miembros y no deben de afectar a la viabilidad económica de las explotaciones. El desarrollo rural contribuye a la biodiversidad del medio, ayuda a prevenir la erosión de los suelos y a controlar la liberación de carbono a la atmósfera. Por este motivo, las medidas que constituyen este paquete van dirigidas a intensificar el desarrollo de zonas rurales, evitando su abandono y revalorizando el papel de agricultores y ganaderos en su conservación (Europa. 2013).

Aquellos agricultores que con estas medidas generan beneficios para el medio ambiente, se verán recompensados. Para lograrlo, el “*greening*” establece que los agricultores recibirán un 30 % de sus pagos con la obligación de cumplir una serie de prácticas beneficiosas acogidas entre estas medidas. Entre las nuevas exigencias en la Política Agraria Común se encuentra: la diversificación de los cultivos en las explotaciones de más de 10 ha debiendo cultivarse al menos

2 cultivos, y 3 las que superen 30 ha; el mantenimiento de pastos permanentes en el mismo nivel que en años anteriores, siendo el año de referencia el 2012; el establecimiento de zonas y áreas de interés ecológico como barbechos, franjas de protección, tierras forestales, cultivos fijadores de nitrógeno, etc. Los cultivos permanentes se califican como verdes y no se les exigirá las condiciones del “greening”.

#### 1.1.4 El trigo

El trigo (*Triticum* spp.) ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, siendo el cereal más cultivado. La mayor diversidad genética de trigos silvestres ocurre en Irán e Israel, y se considera por muchos taxónomos que el grado de variabilidad es una evidencia del lugar de origen (Faris *et al.* 2014). El trigo es una planta monocotiledónea anual que pertenece a la familia de las poáceas (*Gramineae*) (Figura 6). Se utiliza en alimentación humana para la elaboración de panes por la capacidad de cocción de la harina, elaboración de pasta, en la industria alimentaria y en alimentación animal en forma de grano y como forraje.

El trigo es una planta ampliamente adaptada en todo el mundo, se cultiva entre los 30° y 60° de latitud norte y los 25° y 40° de latitud sur, siendo el área de producción más importante la zona templada del hemisferio norte. Por el contrario el trigo se adapta con dificultad a climas templados permanentes. Requiere suelos profundos para el buen desarrollo del sistema radicular, se recomienda que las tierras dispongan de un buen drenaje y crece mejor en suelos neutros o alcalinos (Charmet. 2011).

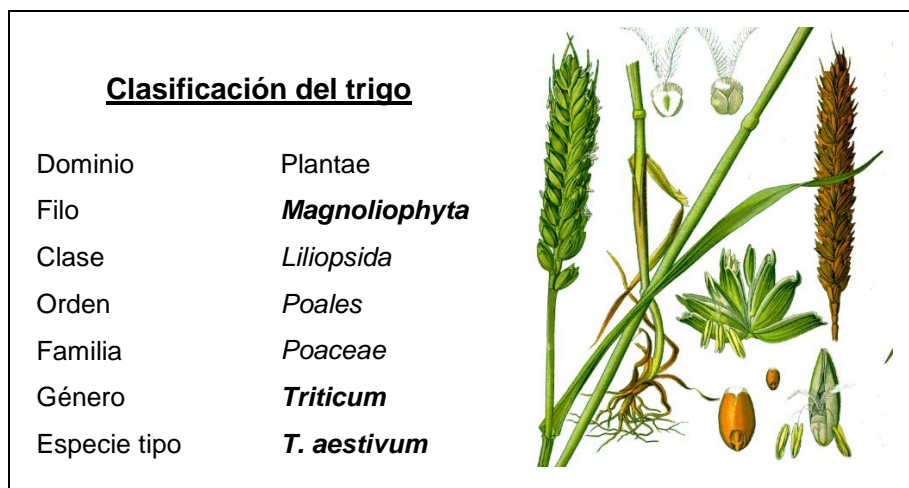


Figura 6. Clasificación del trigo *Triticum aestivum*.

La genética del trigo es más complicada que la de la mayoría de las otras especies de plantas domesticadas. La especie del trigo es un poliploide estable, que tiene más de dos conjuntos de siete cromosomas. El trigo *escaña* (*Triticum monococcum*) es *Diploide* ( $2n = 2x = 14$  cromosomas). Los trigos *Tetraploides* (por ejemplo *Triticum durum*) son derivados del *almidonero* silvestre (*Triticum dicoccoides*). La hibridación que generó el *almidonero*

silvestre ocurrió en tierra virgen, mucho antes de su domesticación. Los trigos *Hexaploides* evolucionaron en campos cultivados. El trigo común del pan (*Triticum aestivum*) evolucionó como una especie hexaploide hace aproximadamente 2000 años. Tanto el trigo *dicoccoides* como el *durum* hibridaron con otra hierba diploide silvestre (*Aegilops tauschii*) para crear los trigos hexaploides (cromosomas 6x), *Triticum spelta* y *Triticum aestivum* (Matsuoka. 2011).

El grano de trigo es una cariósida, las semillas presentan los tegumentos íntimamente unidos a los tegumentos del fruto. El grano presenta un marcado surco ventral y las características de los componentes del grano confieren a éste unas propiedades que dan lugar a distintos tipos de trigo según su aptitud y aprovechamiento. La textura del endospermo puede ser vítrea (granos translúcidos, aspecto vítreo) o harinosa (opacos a la luz, aspecto de tiza o yeso). El carácter vítreo o harinoso varía según las variedades, por ejemplo *Triticum durum* suele ser vítreo y se utiliza para la elaboración de sémolas para pastas alimentarias y el *T. aestivum* suele ser harinoso, aunque también influyen las condiciones ambientales, se utiliza para panificación (Erekul y Köhn. 2006).

### 1.1.5 La cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) se considera uno de los cultivos fundadores de la agricultura antigua en el mundo (Badr *et al.* 2000). Se han encontrado restos de cebada en el Levante mediterráneo, Mesopotamia y Persia (Diamond. 1998) y su progenitor salvaje es *Hordeum spontaneum*, encontrado en Israel, Jordania, el sur de Turquía y el suroeste de Irán (Nevo. 1992). La cebada es una planta monocotiledónea anual que pertenece a la familia de las poáceas (*Gramineae*). La importancia de este cereal se debe a su amplia adaptación ecológica, a su utilización, tanto en alimentación humana como animal, y a que su malta es de gran calidad para la elaboración de bebidas alcohólicas, principalmente la cerveza.

La cebada es más resistente a la salinidad y a la sequía que muchos otros cereales, además presentan una mayor resistencia en suelos ácidos, aunque es menos resistente al frío que el trigo. La cebada es un cultivo de clima templado y se ha extendido por todo el mundo hasta la latitud de 70° latitud norte y 60° latitud sur, es el cereal con mayor diversidad de ambientes. Se consideran lugares de gran desarrollo de la cebada el Himalaya, Etiopía y Marruecos (Molina-Cano. 1989).

Durante años, se ha investigado el género *Hordeum* al que pertenece la cebada, centrándose en su diversidad morfológica, distribución, ecología de las especies y su capacidad de crecimiento, aspectos muy importantes para la mejora genética (Fedak. 1985). La mayoría de las cebadas

cultivadas pertenecen a una sola especie polimorfa *Hordeum vulgare* L. *spp vulgare* (A Figura 7). Las cebadas cultivadas en la actualidad, se clasifican en dos especies que se distinguen según el número de espiguillas. Las cebadas de dos carreras *Hordeum distichoum* L. (Figura 7, B) empleada en la obtención de bebidas alcohólicas, cebadas de seis carreras *Hordeum hexastichum* L. (Figura 7, C) utilizada como forraje para alimentación animal (Brothmer, 1995).

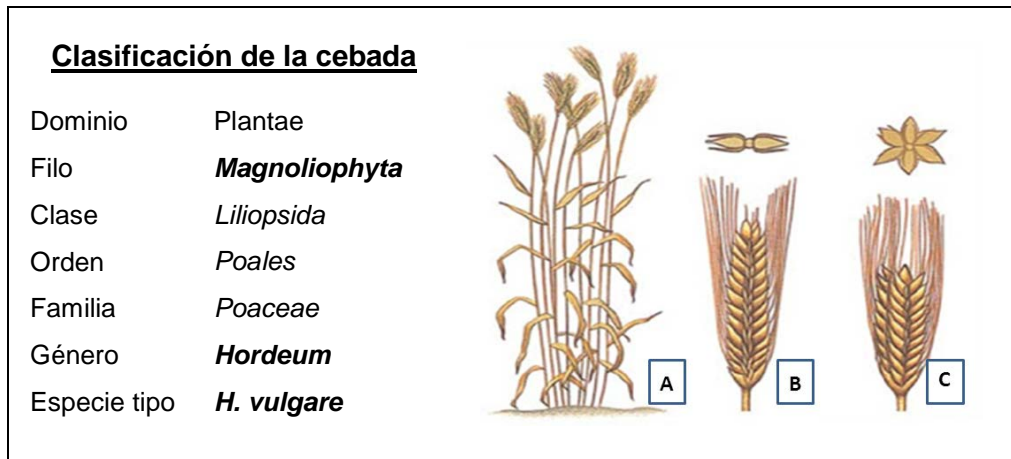


Figura 7. Clasificación de la cebada *Hordeum vulgare* (A), *H. distichon* (B) y *H. hexastichon* (C).

El grano de cebada botánicamente es un fruto del tipo cariósida, constituido químicamente por carbohidratos, proteínas, grasa, fibra, minerales como el calcio, hierro y fósforo, vitaminas, la tiamina, riboflavina y niacina. El fruto de la cebada son granos vestidos, en los que la cariósida se encuentra cubierta por las envueltas florales y presenta una estructura fusiforme con las cubiertas arrugadas llegada la época de maduración (Molina-Cano. 1989).

La cebada se caracteriza por un tallo con estructura de caña, que sujeta la espiga o panícula terminal, que proporciona los granos o semillas. El grano se utiliza como aprovechamiento principal de la planta y la paja como fuente de celulosa en la ración para los rumiantes, así como para cama del ganado, acolchado de suelos como cubierta vegetal en cultivos leñosos y también tiene un aprovechamiento energético, como biomasa.

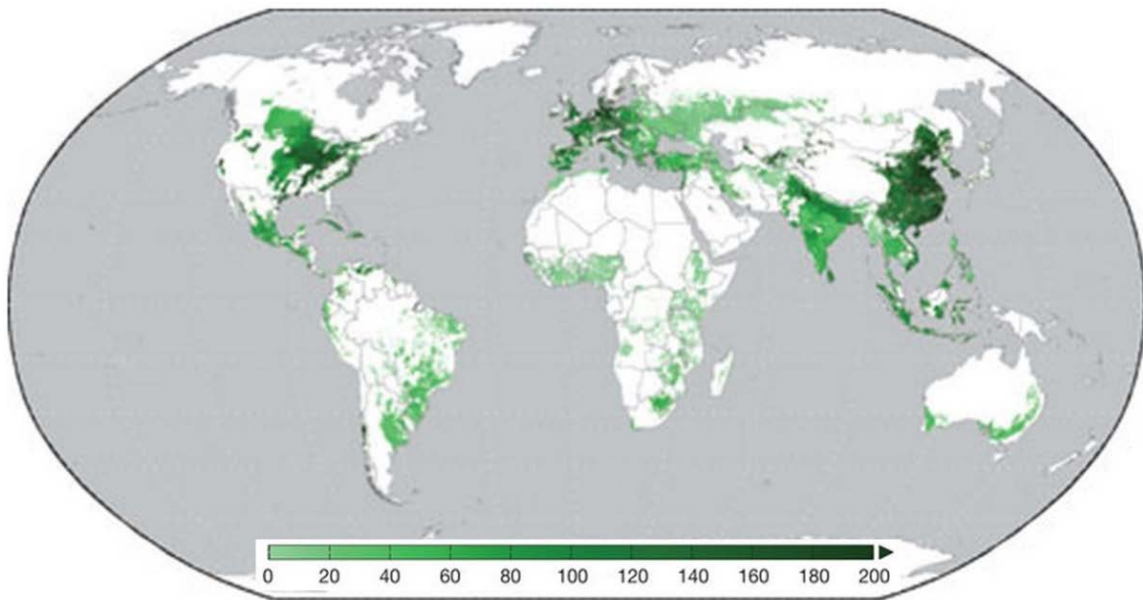
## 1.2 Fertilidad del suelo y nutrición de los cultivos

La nutrición vegetal básica para un óptimo desarrollo de los cultivos depende de la capacidad del suelo para suministrar los elementos nutritivos en la forma, cantidad y momento adecuado a las exigencias del mismo. Se define como fertilidad del suelo a la capacidad para mantener de manera perdurable un nivel de producción estable y de calidad, conservando un estado de alta estabilidad frente a los procesos que implican su degradación, y todo ello dentro de una amplia gama de condiciones locales agroambientales, socioeconómicas y culturales (Labrador. 2001).



Cuando no existe en el suelo suficiente cantidad de nutrientes, mediante la práctica de la fertilización se aumenta dicha concentración (Inpofos. 1993). Por lo tanto, el abonado tiene como objetivo mejorar el suelo como sustrato nutritivo, complementar el suministro natural en casos en los que sea deficitario de elementos nutritivos y restituir los que han sido extraídos por el cultivo o que han desaparecido por otros motivos. De este modo, se consiguen altos rendimientos en las cosechas y producciones de buena calidad.

Los nutrientes que necesitan las plantas, seres vivos autótrofos, se clasifican en macronutrientes, son el N, P, K, los mesonutrientes Ca, Mg y S, y micronutrientes que se necesitan en mucha menor cantidad y son Fe, Mn, Zn, Cu, B y Mo entre otros. Esta división no tiene implicaciones fisiológicas cualitativas ya que todos los elementos son igualmente esenciales para el desarrollo completo del ciclo productivo de las plantas, por lo que todos los nutrientes deben ser considerados en la fertilización del suelo.



**Figura 8. Aplicaciones medias de fertilizantes nitrogenados (Kg N / ha) (Mueller et al.2012).**

La calidad en la práctica de la fertilización no sólo viene determinada por la mera cantidad de fertilizante utilizado, sino por la correcta aplicación del mismo reduciendo al mínimo las repercusiones en la naturaleza (Europa. 1991).

Durante años se ha comprobado que la fertilización es una técnica rentable que permite aumentar la producción de la tierra, reduciendo los costes de producción y mejorando el resultado global de la explotación. El uso de fertilizantes se ha generalizado en todo el mundo, pero en mayor medida en China, EEUU y Europa. En la Figura 8 se muestran los países que presentan una mayor utilización de fertilizantes nitrogenados (Mueller *et al.*2012).

### 1.2.1 Origen de la fertilización del suelo

Desde la antigüedad el hombre se ha interesado por la respuesta de las plantas al ambiente, al principio de manera empírica y después mediante estudios científicos, llegando a comprender que para elevar los rendimientos y la calidad de las cosechas es preciso crear las condiciones necesarias para asegurar el crecimiento y desarrollo normales de las plantas (Alcántar González *et al.* 2007).

La historia de la fertilización se remonta a épocas romanas, se inició cuando los agricultores primitivos descubrieron que determinados suelos dejaban de producir rendimientos aceptables si se cultivaban de manera ininterrumpida. Observaron que al añadir estiércol o residuos vegetales, se mejoraba la fertilidad del suelo. Pero no fue hasta el siglo XV cuando comenzaron las experimentaciones con el fin de averiguar la fuente de nutrientes de las plantas.

Aristóteles (filósofo griego, 384-322 a.C.) estableció la “Teoría del Humus” que considera que las plantas se alimentan de materiales húmicos, los que absorbe a través del sistema radicular. Las especulaciones de Aristóteles aunque erróneas fueron universalmente aceptadas hasta el inicio de la época experimental moderna en el siglo XIV.

Sin embargo, hasta que se tuvo una visión de la fotosíntesis (Senebier 1742-1809 y Theodore de Saussure 1767-1845) no se comprendió que la base de la nutrición de las plantas la constituyen los elementos minerales, mayoritariamente absorbidos por las raíces.

El origen de la **industria mundial de fertilizantes** se inició a mediados del siglo XIX, debido en parte al desarrollo de la minería, comenzándose entonces a comercializar diversos tipos de fertilizantes (nitrato de Chile, guano, etc). En Inglaterra, los químicos del siglo XIX hicieron fertilizantes de superfosfato al tratar los huesos de animales con ácido sulfúrico. En 1871, alrededor de 80 fábricas en Gran Bretaña fabricaban superfosfato. Justus von Liebig, químico alemán del siglo XIX, descubrió el nitrógeno, el fósforo y el potasio en el tejido vegetal y los produjo sintéticamente.

Con el progreso de la química analítica y el desarrollo de instrumentos y equipos más precisos en el siglo XX se logró un notable avance en la nutrición vegetal. En 1903, se sintetizó el primer fertilizante con nitrógeno, el nitrato de calcio, a partir del ácido nítrico. Fritz Haber, químico alemán, desarrolló un método de sintetizar el amoníaco a partir de nitrógeno e hidrógeno, por el cual ganó el Premio Nobel de Química en 1918, por su trabajo que consiguió que la fabricación de nitrógeno fuese económicamente viable. La implementación del proceso de Haber-Bosch permitió extender el uso del N en la agricultura (García- Serrano *et al.* 2010).

De 1920 a 1960 fueron identificados 6 nuevos elementos hierro, magnesio, boro, zinc, cobre, molibdeno, cloro y níquel como indispensables para el desarrollo de las plantas.

En 1933, el gobierno de los Estados Unidos creó la Autoridad del Valle de Tennessee (TVA), que racionalizó la fabricación de fertilizantes. La TVA trabajó para innovar en la producción de fertilizantes mezclados, las mezclas a granel y la industria de fertilizante líquido. Después de la Segunda Guerra Mundial, la industria de fertilizantes evolucionó hasta el punto de fabricar camiones cisterna que inyectaban el amoníaco directamente en el suelo agotado.

La Revolución Verde se produce a nivel mundial y hace referencia al aumento significativo de la productividad agrícola que tuvo lugar entre 1940 y 1970. Este acontecimiento se inició en Estados Unidos y consistió en utilizar variedades mejoradas de los cultivos de mayor importancia, como el maíz, el trigo, etc, cultivando una sola especie en un terreno (monocultivo) y aplicando grandes cantidades de agua, fertilizantes y plaguicidas. En España, durante este período de tiempo se construyeron distintas empresas de fertilizantes que posteriormente en 1977 constituyeron la Asociación Nacional de Fabricantes de Fertilizantes (ANFFE).

Hasta mediados de los 60 la mecanización era muy escasa y la fertilización se realizaba básicamente con fertilizantes simples, generalmente en polvo. En sementera o fondo se mezclaba sulfato amónico, superfosfato y cloruro de potasa y en cobertera se aportaban nitratos. A partir de este momento, se introdujeron una gran variedad de tipos de nuevos fertilizantes, que junto al progreso paralelo de la maquinaria de aplicación y a la obtención de nuevas variedades seleccionadas de creciente capacidad productiva, favorecieron la gran difusión en el uso de los fertilizantes minerales.

El crecimiento del consumo de fertilizantes en los países desarrollados fue continuo, hasta 1973-74, año en que se inició la crisis de la energía caracterizada por una escasez temporal de materias primas, especialmente el petróleo, y hubo una escalada asombrosa de los precios. La repercusión de estos incrementos tuvo un efecto importante en el consumo, que se vio prácticamente congelado durante varios años y perdió el dinamismo anterior (Dominguez. 1989).

Durante los últimos 40 años, el uso de los fertilizantes en global se ha incrementado un 700% (Tilman *et al.* 2001). Por lo tanto, se puede decir que el aumento de la demanda de fertilizantes es constante y tiene lugar en mayor medida en los países emergentes (International Fertilizer Industry Association. 2010).

Se define como **abono o fertilizante** el producto cuya función principal es proporcionar nutrientes a las plantas. Los abonos se clasifican en abonos simples, compuestos y complejos. Se entiende como simple el abono nitrogenado, fosfatado o potásico con un contenido

## Introducción

declarable de un único nutriente principal. El abono compuesto es el obtenido químicamente o por mezcla, o por una combinación de ambos, con un contenido declarable de al menos dos nutrientes principales. Por último, se entiende como abono complejo aquel obtenido mediante reacción química, mediante solución, o en estado sólido mediante granulación, y con un contenido declarable de, al menos, dos nutrientes principales. En su estado sólido cada gránulo contiene todos los nutrientes en su composición declarada (España. 2013).

**Tabla 3. Evolución del consumo de productos fertilizantes en España. Datos en % (Domínguez. 1989).**

Productos		1960	1970	1980	1990
<b>Fertilizantes nitrogenados (N)</b>	Sulfato amónico	65	26	9	8
	Nitratos amónico	15	34	42,9	34
	Nitrato sulfato amónico	8	7	4,6	2
	Urea		9	19,0	23
	Nitratos de Chile y Cal	12	4	1,0	1
	Soluciones		3	3,5	6
	Complejos NPK		17	20,0	26
<b>Fertilizantes fosfatados (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b>	Superfosfato simple	98	56	24,3	6,5
	Súper concentrado			0,5	3,5
	Complejos NPK		43	74,8	90
	Otros	2	1	0,4	
<b>Fertilizantes Potásicos (K<sub>2</sub>O)</b>	Cloruro de potasa	100	29	6,3	36
	Sulfato de potasa		16	7,5	3
	Complejos NPK		55	86,2	61

Los abonos complejos sustituyeron al sulfato amónico, superfosfato y cloruro de potasa, combinación tradicional de fertilización. En 1988 se actualizó la legislación española armonizándola con la europea permitiendo la comercialización de todos los fertilizantes admitidos con las exigencias mínimas para complejos de 20 % de concentración total de nutrientes y contenido mínimo de 3 % de N, 5 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 5 % de K<sub>2</sub>O (España. 1988). La tabla 3 muestra la consolidación del uso de los nitratos amónicos, la urea y los abonos complejos durante la segunda mitad del siglo XX.

### 1.2.2 Evolución de los nutrientes en el suelo y aporte mediante fertilización

La actividad química de un suelo depende en gran medida de la importancia que tiene el complejo arcillo-húmico formado por arcilla, materia orgánica y calcio. En la solución del suelo se encuentran las sales disueltas del suelo y los fertilizantes, disociadas en aniones SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y NO<sub>3</sub> y cationes NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, Mg<sub>2</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y K. El complejo arcillo-húmico retiene los cationes, el fosfato también es retenido mediante puentes de calcio y óxidos de Fe, Al y Mn; sin embargo el nitrato no se retiene en el suelo.

El **nitrógeno** es el elemento más abundante de la atmósfera (el 78 % está constituido por nitrógeno). Sin embargo, el nitrógeno del aire es inerte y no puede ser directamente aprovechado por los vegetales ni tampoco por los animales, porque se encuentra inmovilizado entre sí mediante un triple enlace estable y fuerte ( $N_2$ ). En los ecosistemas naturales el nitrógeno que toman las plantas deriva de la materia orgánica, y ésta tiende a permanecer relativamente constante dependiendo del clima, tipo de suelo y de la cobertura vegetal. Cuando se modifica este equilibrio, el nivel final de nitrógeno en el suelo depende del manejo del sistema agrícola, pues se altera el balance entre los mecanismos de pérdidas y ganancias de N.

El nitrógeno en el suelo se encuentra en su mayor parte en forma orgánica, formando parte de proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos, etc, e interviene en los procesos de absorción iónica, fotosíntesis, respiración, multiplicación y diferenciación celular, y en todo el metabolismo. El nitrógeno en la solución del suelo debe mineralizarse a ion amonio ( $NH_4^+$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ), para que las plantas lo asimilen. Estos procesos de mineralización de la materia orgánica o amonificación y nitrificación se llevan a cabo por los microorganismos del suelo y dependen de múltiples factores (Hofman y Van Cleemput. 2004). La amonificación está muy influenciada por los cambios en el entorno o ambiente debido a la gran diversidad filogenética de microorganismos que intervienen en este proceso. Por el contrario, en la nitrificación u oxidación de amonio es más estable debido a que se produce gracias a especies de géneros muy concretos (Isobe y Ohte. 2014).

Los principales fertilizantes nitrogenados minerales aportan el nitrógeno en forma de amonio ( $NH_4^+$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) y urea [ $CO(NH_2)_2$ ] (Tabla 4). En los fertilizantes nitrogenados que incorporan urea de naturaleza química, el nitrógeno se encuentra en forma amídica ( $NH_2$ ) produciéndose su hidrólisis a  $NH_4^+$  durante las dos primeras semanas de la aplicación en el suelo (Trenkel. 2010). Este nitrógeno está expuesto a volatilizarse en forma de amoniaco ( $NH_3$ ) mientras está en la superficie del suelo. Cuando el  $NH_4^+$  se incorpora al suelo es retenido por el complejo arcillo-húmico.

En la actualidad, los fertilizantes nítricos utilizados en agricultura se presentan en múltiples formulaciones (Tabla 4). Estas formulaciones también son susceptibles de generar pérdidas, la mayor parte por lixiviación. Sin embargo, el proceso de desnitrificación también libera nitrógeno a la atmósfera en forma de  $N_2O$  estimándose que el 70 % del total de las emisiones de este gas se deben a la acción del hombre en la agricultura y en la industria (Kroeze. 1994). La cuantificación de las pérdidas en cada una de estas formas es una tarea difícil debido a incertidumbres como la estimación de la profundidad de drenaje, la concentración de N del agua, la cantidad de agua retenida en los poros del suelo, etc. En la actualidad, por ejemplo, para el N lixiviado no existe un método o modelo ampliamente utilizado (Van der Laan *et al.* 2014).

Tabla 4. Principales fertilizantes nitrogenados (España. 2013).

Tipos de fertilizantes nitrogenados		Riqueza (% de N)	Formas del nutriente
<b>Amoniacal</b>			
Sulfato amónico	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	Nitrógeno amoniacal
Cianamida cálcica	$\text{CN}_2\text{Ca}$	18	Nitrógeno amoniacal
Urea	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	44	Nitrógeno amoniacal
Nitrato amónico	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	20	Nitrógeno amoniacal y nítrico
Nitrato amónico cálcico, etc	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{NH}_4\text{NO}_3$	27	Nitrógeno amoniacal y nítrico
<b>Nítricos</b>			
Nitrato cálcico	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	15	Nitrógeno nítrico
Nitrato sódico	$\text{NaNO}_3$	15	Nitrógeno nítrico
Nitrato magnésico	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	10	Nitrógeno nítrico
Nitrato amónico	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	20	Nitrógeno amoniacal y nítrico
Nitrato amónico cálcico, etc	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\text{NH}_4\text{NO}_3$	27	Nitrógeno amoniacal y nítrico
<b>De acción controlada</b>			
Urea formaldehído	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	36	Nitrógeno amoniacal
Sulfato amónico con inhibidor de la nitrificación, etc	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	Nitrógeno amoniacal

El manejo adecuado de la fertilización es clave para aumentar la eficiencia en el uso del nitrógeno y disminuir las pérdidas, y por lo tanto, el consiguiente impacto en el medio ambiente. Para maximizar la eficiencia en el uso del nitrógeno, es necesario sincronizar las prácticas de fertilización con los periodos de máximas demandas del cultivo. (Cassman *et al.* 2002, Dobermann y Cassman. 2005).

Las principales ganancias de nitrógeno en el suelo se producen con el N aportado por los fertilizantes, el N que proviene de la fijación simbiótica y no simbiótica, el N proveniente de la mineralización de la materia orgánica (restos vegetales y animales) y en menor medida el N arrastrado por las precipitaciones. Los principales mecanismos de pérdidas en el suelo son la extracción del N por los cultivos, la inmovilización, la desnitrificación, la erosión, la volatilización y la lixiviación.

El **fósforo** es un macronutriente esencial que forma parte de las plantas, se requiere para la formación de ácidos nucleicos, fosfolípidos y del ATP molécula de reserva de energía para las plantas (Schachtman *et al.* 1998). Aunque interviene en todo el metabolismo en general, se puede decir que sus funciones principales residen en el almacenamiento y la transferencia de energía.

A diferencia del N, el fósforo no forma compuestos gaseosos, se encuentra en fase sólida, una mayor parte en forma mineral y una parte muy pequeña en forma orgánica. Su principal

característica es su baja disponibilidad en el suelo, encontrándose en formas poco móviles (Shenoy y Kalagudi. 2005).

Desde el punto de vista agronómico, el fósforo puede estar presente en el suelo en cuatro formas: en la solución del suelo (asimilable), fijado por el complejo arcillo-húmico, por lo tanto cambiante o lábil, como componente de la materia orgánica, precipitado con hierro o aluminio (en suelos ácidos) y precipitado con el calcio en suelos básicos (lentamente asimilable) y formando parte de la roca madre (no asimilable).

Las características físicas y químicas del suelo determinan la capacidad y el ritmo al que el suelo es capaz de reponer el fósforo que las plantas van tomando de la solución. En este proceso influyen, fundamentalmente, la textura, el pH, la caliza activa y la materia orgánica. En definitiva, la fertilidad del suelo en fósforo es la cantidad de fósforo asimilable presente, y se entiende por asimilable la fracción extraíble con ácidos débiles a una concentración definida (INIA. 2009).

En la solución del suelo, el fósforo se encuentra en diferentes formas iónicas  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , dependiendo del pH su mayor o menor abundancia. En los suelos ácidos existe predominio de iones monovalentes, en suelos neutros éstos suponen el 50 % aproximadamente y en suelos básicos aumenta el predominio de iones divalentes y trivalentes. La inmovilización del fósforo a formas estables o retrogradación provoca que la mayor parte del fósforo aplicado no se encuentre en formas asimilables por la planta.

La clasificación de los fertilizantes fosfatados se realiza en función de su riqueza en fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) y de la solubilidad de dicho fósforo en medio acuoso o alcalino (Tabla 5).

**Tabla 5. Clasificación de los fertilizantes fosfatados (España. 2013).**

<b>Tipos</b>	<b>Riqueza</b> (% de $\text{P}_2\text{O}_5$ )	<b>Solubilidad</b>
Superfosfato simple	16	93 % soluble en agua
Superfosfato concentrado	25	93 % soluble en agua
Superfosfato triple	38	93 % soluble en agua
Fosfato roca parcialmente solubilizado	20	40 % soluble en agua
Fosfato bicálcico	38	75 % en citrato amónico alcalino
Fosfato calcinado	25	100 % en citrato amónico alcalino
Fosfato aluminocálcico	30	75 % en citrato amónico alcalino
Fosfato roca blando	25	55 % soluble en ácido fórmico al 2 %

La mejora en la eficiencia del uso del fósforo requiere una mejora en la eficiencia de absorción por la planta desde el suelo, para que repercuta en un mayor crecimiento de la planta y en una mayor cantidad de biomasa cosechada (Veneklaas *et al.* 2012). Las raíces vegetales toman el fósforo en contra de gradiente, ya que en las células de la raíz la concentración es 100-1000

## Introducción

veces la de la solución del suelo (Syers *et al.* 2008). La absorción del P y su movilidad varían incluso entre especies y variedades.

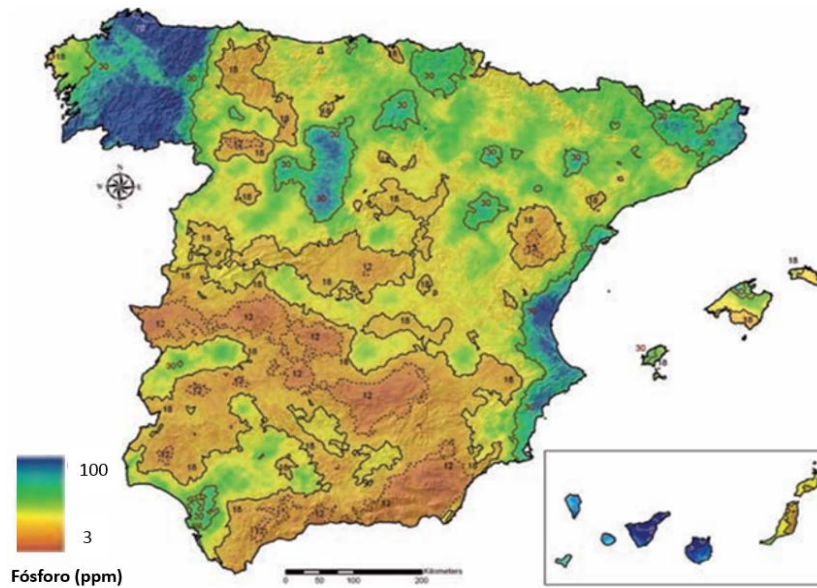


Figura 9. Contenido en fósforo asimilable de los suelos españoles (INIA 2009).

Los niveles de fertilidad del suelo según el fósforo, varían mucho en función de la textura del suelo. Por ejemplo para suelo arenosos se considera un nivel de fertilidad medio entre 9-12 ppm, mientras que en suelos arcillosos se considera un contenido medio 17-24 ppm de P (INIA. 2009). Los suelo españoles, presentan gran variación en el contenido en fósforo asimilable (Olsen), como se demostró en un estudio realizado por el INIA a casi 4.000 suelos (Figura 9).

El **potasio** se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, pero en su mayor parte se encuentra en forma de minerales insolubles (feldespatos, micas, biotita, ilitas, vermiculitas, entre otros). La meteorización libera potasio hidrosoluble e intercambiable, que puede ser absorbido por las plantas. En la planta el potasio interviene en procesos osmóticos, apertura y cierre de estomas, fotosíntesis, transporte de carbohidratos y otros productos, respiración, síntesis y fijación simbiótica del nitrógeno (Alcántar González. 2007).

El potasio hidrosoluble y el presente en la materia orgánica del suelo, representa una fracción muy pequeña del total. Sin embargo, debido al equilibrio dinámico existente entre las formas del potasio hidrosoluble, intercambiable y fijado, se pueden abastecer los requerimientos vegetales. Una concentración de sólo 0,01 ppm en una solución nutritiva es suficiente para las plantas, si se mantiene constante (Armenta-Bojórquez *et al.* 2001).

Los mesonutrientes **calcio y magnesio** se encuentran en la solución del suelo como cationes y actúan como activadores enzimáticos y modifican la estructura terciaria de las proteínas.



Participan en la regulación del potencial osmótico y en el balance de aniones, controlando la permeabilidad de membrana y otros electropotenciales (Humbert. 2013).

El calcio en el suelo se encuentra presente en muchos minerales comunes como en la calcita, dolomita, apatitos y feldespatos cálcicos. El catión calcio  $\text{Ca}^{2+}$  sufre los procesos de lixiviación, absorción por las plantas, adsorción en el complejo de intercambio y reprecipitación (Kirkby y Pilbeam. 2006).

El magnesio se estima que constituye 1,93 % de la corteza terrestre, formando parte de minerales primarios y secundarios como la biotita, dolomita, clorita, serpentinas, y talco, entre otros. Al liberarse  $\text{Mg}^{2+}$  puede ser lixiviado, absorbido por las plantas o reprecipitado.

### **1.2.3 Técnicas de aplicación**

La técnica de fertilización tiene como objetivo asegurar la máxima rentabilidad y eficacia en la aplicación de los fertilizantes logrando la máxima absorción de los elementos nutritivos al menor coste posible. Para lo cual, se deben determinar los siguientes parámetros: dosis de elementos nutritivos, época de aplicación, localización de los fertilizantes en el suelo, forma química o tipo de fertilizante y sistema de aplicación o distribución (España.2013).

La eficiencia de la fertilización exige que el cultivo disponga de los elementos nutritivos en cantidad suficiente en la zona radicular en cada momento a lo largo de su ciclo vegetativo, pudiendo la escasez de un determinado elemento tener graves consecuencias para la producción, por ello se debe determinar la época de aplicación para que se produzca la máxima absorción en las fases de desarrollo más intensas del ciclo vegetativo.

Para realizar de un modo coherente y económico el mantenimiento de la fertilidad del suelo es conveniente hacer una planificación de la fertilización a medio-largo plazo, así como un control periódico de la fertilidad del suelo.

El Código de Buenas Prácticas Agrarias fue elaborado para responder a la Directiva del Consejo 91/676/CEE, de 12 de diciembre de 1991, y al R.D. 26/1996 de 16 de febrero, relativo a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias. El Código sirve para el desarrollo de una agricultura compatible con el medio ambiente, para una utilización racional de los fertilizantes nitrogenados y para elaborar programas de acción específicos para zonas vulnerables.

Recientemente se ha incrementado la demanda de productos de alta solubilidad utilizados en disoluciones nutritivas para cultivos, debido a la mejora en las técnicas de riego con gran aprovechamiento del agua, como el riego por goteo o localizado, que permiten una aplicación

altamente eficaz de los elementos fertilizantes mediante estos productos. La fertirrigación comprende la aplicación de fertilizantes en el agua de riego. Las cantidades de fertilizante a aplicar dependerán de las necesidades específicas del cultivo y de su distribución en el agua de riego (España. 2013).

En la actualidad, la agricultura cada vez más competitiva, va demandando un mayor número de productos más especializados, adaptados a los diferentes cultivos o técnicas de cultivo, como son los fertilizantes cristalinos, productos líquidos o para aplicación foliar, correctores de carencias, etc.

### **1.2.4 Situación actual de los fertilizantes y legislación**

En la actualidad, la agricultura es cada vez más competitiva y pretende mantener la productividad de manera sostenible en el tiempo. Para lograrlo, es necesario llevar a cabo el máximo aprovechamiento de los recursos mediante el aumento de la eficiencia en el uso de los nutrientes y la minimización del impacto de los fertilizantes en el medioambiente (MAGRAMA. 2013).

En esta línea, la Unión Europea aprobó el Reglamento (CE) 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los abonos. Esta disposición comunitaria refunde, simplifica y actualiza toda la normativa existente en la Unión Europea sobre los fertilizantes minerales de uso más generalizado en la agricultura, fijando una serie de normas sobre su composición química, identificación, etiquetado, envasado, medidas de control, etc., junto con una serie de anexos sobre características de los abonos, márgenes de tolerancia, métodos de análisis, especificaciones sobre el nitrato amónico por su riesgo de explosión y acreditación de laboratorios.

Dicho reglamento durante los últimos 10 años ha sufrido las siguientes adaptaciones al progreso técnico:

1ª Reglamento (CE) Nº 2076/2004 se modifica por primera vez el anexo I, relativo a los abonos EDDHSA y superfosfato triple.

2ª Reglamento (CE) Nº 162/2007 adaptación al progreso técnico los anexos I y IV sobre quelatos de hierro, agentes quelantes y corrección de métodos de análisis.

3ª Reglamento (CE) Nº 1107/2008 actualización de los mismos anexos pero en este caso el contenido de sulfato amónico, inhibidores de la nitrificación y de la ureasa, y corrección de la concentración de yodo en los método de análisis.

4ª Reglamento (CE) Nº 1020/2009 por el que se adaptan los anexos I, II, III y IV (sulfato de roca con magnesio, sulfato de magnesio con micronutrientes, analítica de nitrato amónico, actualización de métodos de análisis y requisitos para autorización de laboratorios de control.

5ª Reglamento (UE) Nº 137/2011 por el que se adaptan los anexos I y IV, englobando las modificaciones de abonos con nutrientes esenciales, quelatos de micronutrientes y métodos validados de análisis.

6ª Reglamento (UE) Nº 223/2012 por el que se adaptan los anexos I y IV, actualiza en concreto las soluciones, las suspensiones y los abonos mezclados con micronutrientes.

7ª Reglamento (UE) Nº 463/2013 por el que se adaptan los anexos I, II y IV, incluye modificaciones enmiendas calizas, fertilizantes calizos, ácido lignosulfónico y sal potásica.

Respecto a los fertilizantes de orgánicos se estableció el Reglamento Nº 1774/2002 que contiene las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.

En cuanto a las disposiciones nacionales cabe destacar el Real Decreto 824/2005 de 8 julio sobre productos fertilizantes, regula aspectos del Reglamento (CE) Nº 2003/2003, define y tipifica los productos distintos de los abonos CE, garantiza riquezas y contenidos, previene riesgos para la salud y el medio ambiente y establece la inscripción previa en el Registro de abonos y enmiendas con componentes orgánicos. Establece los requisitos del fabricante y las medidas de control en los laboratorios. Esta disposición tuvo una actualización con el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio sobre productos fertilizantes. En este Real Decreto se presta una especial atención a los productos elaborados con materias primas de origen orgánico, entre los que cabría citar abonos orgánicos y órgano-minerales, determinados abonos minerales, abonos especiales, enmiendas calizas y enmiendas orgánicas.

En España, en el 2006 se crea y regula el Comité de Expertos en Fertilización y en el 2010 se aprueba el modelo normalizado de comunicación al Registro de Productos Fertilizantes.

## 1.3 Interacción planta-microorganismo y su papel en la nutrición de los cultivos

### 1.3.1 La rizosfera

En el momento en que las plantas colonizaron el planeta, se presentó una gran oportunidad para los microorganismos. Las raíces de las plantas y el suelo bajo su influencia denominado rizosfera, han representado para las bacterias un hábitat rico y dinámico donde proliferar (Hinsinger. 2009). La rizosfera se considera uno de los ecosistemas terrestres más importantes en términos energéticos y de extensión; en él se producen complejas y diversas interacciones entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo (Figura 10) (Ambardar y Vakhlu. 2013).



Figura 10. Importancia de los microorganismos en el suelo (Castro Pinto. 2011).

El término rizosfera se utilizó por primera vez por Hillner en 1904 y constituyen un espacio en el que están presentes de manera inagotable sustancias exudadas por las raíces de las plantas como aminoácidos, proteínas, enzimas, azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas (Tabla 6). En este ecosistema, los exudados producidos por las raíces de las plantas son utilizados por las bacterias como fuente de energía. Las plantas liberan exudados de distinta composición y en distinta cantidad, dependiendo de la especie, la edad y su estado de desarrollo. La composición de los exudados varía en cada planta, afectando a los microorganismos de la rizosfera (Somers *et al.* 2004) (Tabla 6).

Numerosos factores influyen en la diversidad de las comunidades bacterianas de la rizosfera, como el clima y la estación, el suelo y su estructura, y la planta y su estado de desarrollo (Berg y Smalla. 2009, Marschner *et al.* 2001). En la parte que corresponde al suelo y su estructura, se ha demostrado que la biogeografía microbiana está controlada por variables edáficas,

principalmente el pH (Fierer y Jackson. 2006). Aunque también influyen factores como el contenido en nutrientes del suelo y la humedad, en cuanto a la especie vegetal influye la identidad de la planta y como ya hemos visto, los exudados radiculares (Chaparro *et al.* 2012, Chen *et al.* 2013).

**Tabla 6. Exudados radiculares producidos por las raíces de las plantas y liberados a la rizosfera.**

<b>Exudados radiculares</b>	
Aminoácidos	Asparagina, alanina, glicina, cistina/cisteinmetionina, fenilalanina, tirosina, treonina, lisina, prolina, triptófano, $\beta$ -alanina, arginina, homoserina, cistationa, L-metionina.
Ácidos orgánicos	Tartárico, oxálico, cítrico, malico, acético, propiónico, succínico, fumárico, glicólico, valérico, malónico, butírico.
Azúcares	Glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa, ribosa, arabinosa, rafinosa, ramnosa, oligosacáridos y polisacáridos.
Vitaminas	Biotina, tiamina, niacina, ácido pantoténico, riboflavinas y ácido pantoténico.
Purinas/nucleótidos	Adenina, guanina, uridina y citidina.
Enzimas	Fosfatasas ácidas, amilasas y proteasas.
Iones inorgánicos	Cationes 71 % ( $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^{+}$ , $\text{K}^{+}$ , $\text{NH}_4^{+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ ), aniones 12 % ( $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{Cl}^{-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{NO}_3^{-}$ ) radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno.
Otros compuestos	Sideróforos, saponinas, ácidos fenólicos.

### 1.3.2 Interacción planta-microorganismo

La mayor parte de los microorganismos del suelo que interaccionan con las plantas, tanto hongos como bacterias, han coevolucionando con las mismas. Estos microorganismos presentan un alto grado de especificidad y pueden modificar el suministro de nutrientes para la planta y ésta modificar la calidad y la cantidad de los exudados producidos, mejorando de esta manera la interrelación que se produce en la rizosfera (Raaijmakers *et al.* 2009, Germida y Siciliano. 2001, Graner *et al.* 2003 y Kang *et al.* 2010).

Las **interacciones beneficiosas** entre microorganismos y plantas incluyen desde el incremento de la tasa de germinación, un mayor desarrollo radicular, de la biomasa aérea, de la superficie foliar, además de un incremento en el contenido de clorofila, absorción de nutrientes, una mayor tolerancia a estrés abióticos y actúan como biocontroladores (Mahaffee y Kloepper. 1994; Raaijmakers *et al.* 1997; Bashan *et al.* 2004; Mantelin y Touraine. 2004; Bakker *et al.* 2007; Yang *et al.* 2009).

## Introducción

Los efectos beneficiosos que producen los microorganismos en las plantas pueden ser de varios tipos y se dividen en directos e indirectos. Los mecanismos directos son la fijación biológica de nitrógeno, el aumento de la disponibilidad de ciertos nutrientes, el incremento de la superficie radicular, el efecto sinérgico con otras bacterias beneficiosas del interior de la planta, entre otros. Los efectos beneficiosos indirectos son el control de agentes patógenos y la inducción de rutas de defensa de la planta (Vessey. 2003).

Estas interacciones entre microorganismo-planta-medioambiente son estudiadas para su aprovechamiento en agricultura para mejorar el desarrollo, a nivel agronómico, de los cultivos (Barea *et al.* 2005). En consecuencia, en base a los avances en el conocimiento sobre la interacción planta/microorganismo, es posible la aplicación de procesos biotecnológicos que aporten un gran beneficio en áreas como la producción vegetal, la producción de fitosanitarios, biofertilizantes y productos de fitorremediación.

La asociación rizobio-leguminosa es una de las más estudiadas y presenta una gran especificidad (Long. 2001). El estudio de esta interacción se inició en 1886 con el descubrimiento de las rizobios simbiotes. Por primera vez, se denominó *Rhizobium leguminosarum* a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas (Frank. 1889). Estas bacterias se asocian a las raíces de las leguminosas y viven dentro de nódulos, donde fijan nitrógeno y lo comparten con la planta (Taiz y Zeiger. 2006).

En la actualidad, se sabe que existen sistemas de comunicación y señalización especializados entre los microorganismos que regulan procesos biológicos como rutas complejas del metabolismo de las plantas, la activación del sistema defensivo de la planta y el desarrollo de sistemas de comunicación como el *quorum sensing*. Se entiende como *quorum sensing* al diálogo molecular de las bacterias de la rizosfera y su efecto sobre la fisiología de la planta (Fuqua *et al.* 1994). Las bacterias establecen respuestas fisiológicas mediante la activación específica de genes que se basan en su densidad de población. Se ha demostrado la capacidad de las bacterias de percibir las condiciones ambientales que les rodean y se ha confirmado que pueden comunicarse entre ellas mediante compuestos químicos difusibles, permeables a través de la membrana, autoinductores que son liberados al exterior (Quiñones *et al.* 2005), los más comunes son las Acil-Homoserin-Lactonas (AHL) (Pérez-Montaño. *et al.* 2014).

La coevolución planta-microorganismo ha determinado que muchas plantas sean capaces de exudar por las raíces compuestos que mimeticen estas moléculas señal o autoinductores (Megías *et al.* 2013). Las posibles manifestaciones de este *quorum sensing* pueden utilizarse como una herramienta de gran utilidad para evitar el ataque de patógenos y mejorar la capacidad nutritiva de los suelos (Bedmar *et al.* 2006).

Las **interacciones negativas** que se establecen entre microorganismos y plantas, incluyen las enfermedades causadas por microorganismos patógenos, pero también acciones como alteraciones en la disponibilidad de agua, iones y otras sustancias que mejoran el crecimiento de las plantas, provocando alteraciones en la raíz o limitando su crecimiento (Huang *et al.* 2013).

Hoy en día, con el auge sin precedentes del comercio mundial de productos agrícolas, las plagas y enfermedades de las plantas siguen representando un desafío importante para la producción de alimentos y la seguridad alimentaria. Las plagas y las enfermedades de las plantas tienen serias repercusiones en la producción de alimentos: todos los años la producción agrícola mundial se reduce del 20 al 40 % a causa de estas plagas y enfermedades (FAO. 2013). Por este motivo, durante años, esta interacción negativa ha sido la más estudiada.

Los agentes infecciosos tanto hongos, como bacterias y virus, despliegan sus mecanismos de patogenicidad en las plantas, provocando graves daños en los cultivos. Los factores ambientales temperatura y humedad, juegan un papel importante en el desarrollo de las enfermedades en las plantas. Diversos estudios han determinado que el efecto de la bacteria patógena varía en función de las condiciones del suelo (Mehboob *et al.* 2009). Un factor favorable para el control de la enfermedad es que su difusión se ve limitada por la gran especificidad que se establece entre la planta y el microorganismo. Debido al gran interés por controlar estas enfermedades, se investigan las causas de esta especificidad y el papel de las bacterias beneficiosas en el incremento de la producción y el control de las enfermedades (Montesinos *et al.* 2002).

### **1.3.3 Interacciones positivas. Bacterias PGPR**

En la actualidad, se conocen multitud de especies bacterianas que se asocian a las raíces de diferentes especies vegetales y afectan de manera positiva en el crecimiento de la planta. Estas bacterias beneficiosas de la rizosfera tienen capacidad para promover el crecimiento vegetal y se denominan "*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*" (PGPR) (Haas y Keel 2003).

Las principales clases de microorganismos que constituyen el heterogéneo grupo de PGPR son bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* (*Bacilli*), *Proteobacteria* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -*proteobacterias*) y *Actinobacteria*, y también se incluyen hongos *Glomeromycota* (Pérez-Montañaño *et al.* 2014).

Según Glick, la mejora observada en el crecimiento de las plantas como consecuencia de la actividad PGPR, es el resultado de la combinación y la interacción de varios mecanismos de acción: la mejora de la nutrición de las plantas, la estimulación del crecimiento, la superación de situaciones de estrés de la planta y su actuación como agentes de control biológico (Figura 11). Se considera que las rizobacterias son la mayor fuente de reciclaje de nutrientes en los suelos y por consecuencia, son cruciales para su fertilidad (Glick. 2012).

## Propiedades PGPR

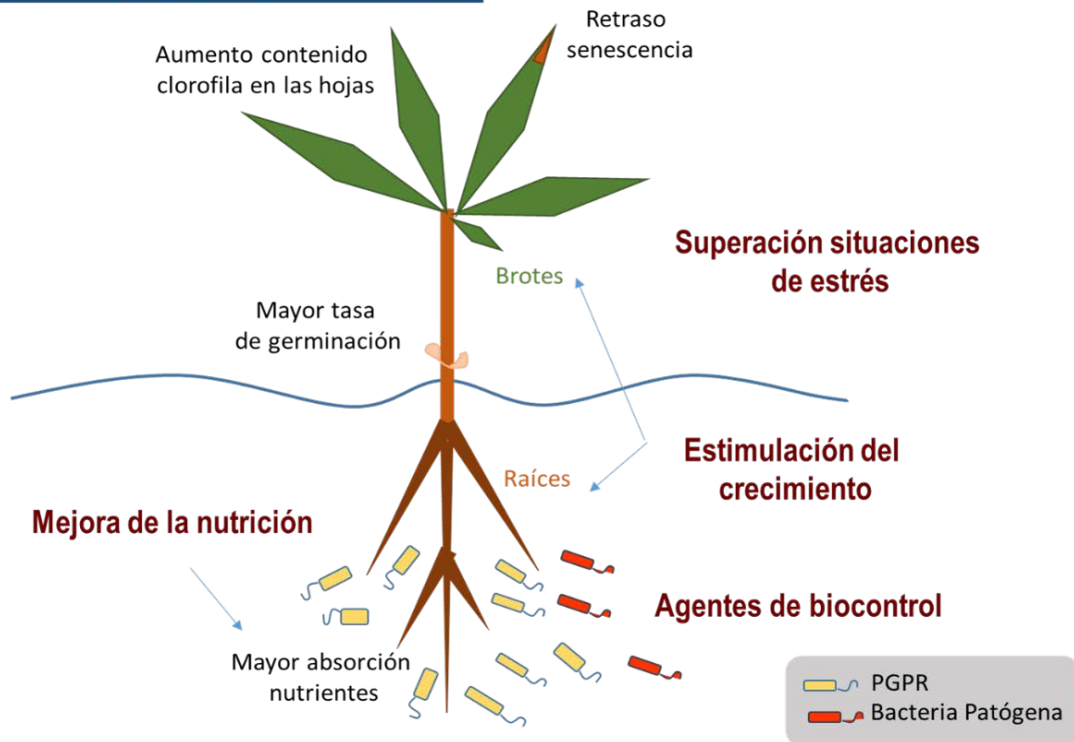


Figura 11. Esquema de las principales acciones de las bacterias PGPR.

### 1.3.3.1 Mejora de la nutrición de las plantas

Entre los microorganismos que mejoran la nutrición de las plantas, destacan los microorganismos fijadores de nitrógeno, tanto en vida libre como en simbiosis con las leguminosas. Este proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) presenta una característica común en todos los microorganismos involucrados y es la presencia del sistema enzimático nitrogenasa, que les permite la reducción de  $N_2$  molecular hasta la forma asimilable  $NH_4^+$  (Mulas *et al.* 2011).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno en vida libre pertenecen a diversas familias, por ejemplo las que engloban a microorganismos autótrofos *Rhodospirillaceae*, *Chlorobiaceae* y *Cyanobacteriae*, organismos de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio*, también bacterias Gram negativas heterótrofas *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y Gram positivas *Clostridium* y *Paenibacillus* (James. 2000).

Además, la inoculación con especies PGPR estimula el crecimiento incrementando la superficie de las hojas y como consecuencia la fotosíntesis, mejorando la nutrición y dando lugar a un incremento de la biomasa total de la planta (Baset *et al.* 2010).



El fósforo en el suelo constituye uno de los principales limitantes del crecimiento vegetal y de la productividad de los cultivos (Khan *et al.* 2007). En los suelos agrícolas, los fertilizantes químicos son la principal fuente de fosforo disponible para las plantas, pero gran parte (hasta el 80 %) de este elemento reacciona con los constituyentes del suelo pasando a formas no asimilables por las plantas (Wu *et al.* 2009). Se han encontrado, bacterias de diferentes géneros capaces de movilizar el fósforo del suelo (Figura 12) de formas inorgánicas a formas asimilables por la planta y viceversa (Dobbelaere *et al.* 2003). La síntesis de ácidos orgánicos por los microorganismos de la rizosfera provoca la bajada del pH, por este motivo se produce la solubilización de las fuentes de P inorgánico y otros nutrientes del suelo (Glick *et al.* 1995). Así mismo, se ha demostrado recientemente la estimulación del crecimiento debido a la solubilización de fosfatos minerales y otros nutrientes (Hayat *et al.* 2010).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos secretan ácidos orgánicos y enzimas (fosfatasas y fitasas) que actúan sobre los fosfatos insolubles y lo transforman en solubles y de este modo, aportan fosforo asimilable para las plantas (Lavakush *et al.* 2014). En muchos casos, estas bacterias solubilizadoras de fosforo, también producen aminoácidos, vitaminas y sustancias promotoras del crecimiento que mejoran el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Vessey. 2003).

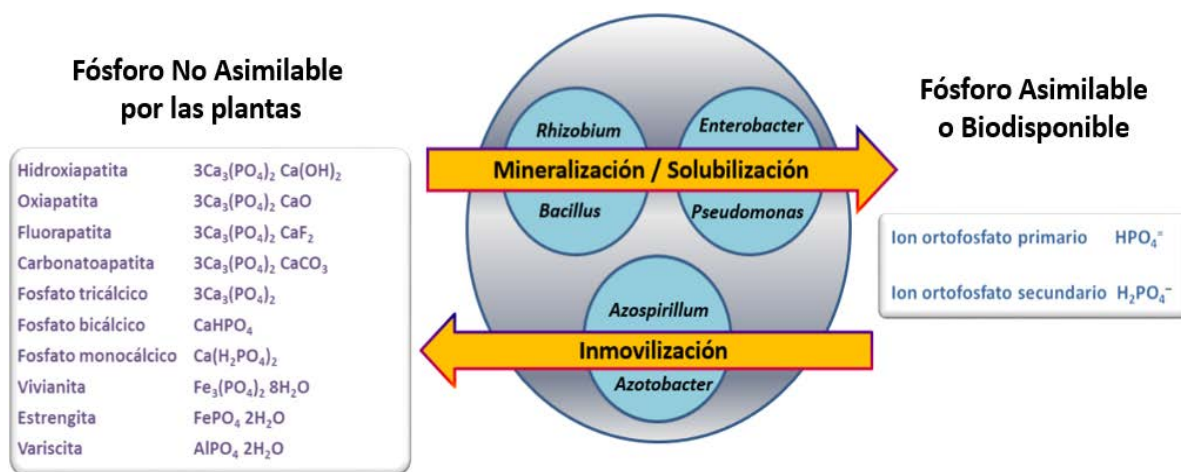


Figura 12. Movilización e inmovilización del fósforo en el suelo por las rizobacterias (Modificado Behera *et al.* 2013).

En la fisiología de la planta, el hierro es el elemento que interviene en la síntesis de la clorofila, actúa como co-factor en múltiples reacciones enzimáticas y forma parte de los citocromos. Su deficiencia causa graves alteraciones en la planta. En la mayor parte de los suelos, pese a que la cantidad de hierro es alta, no está disponible para las plantas pues forma óxidos e hidróxidos insolubles. En hábitats microbianos aeróbicos el  $\text{Fe}^{2+}$  es oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  formando compuestos insolubles, no asimilables. Algunos microorganismos del suelo producen sideróforos, compuestos de bajos pesos moleculares excretados por los microorganismos con la capacidad

## Introducción

de ser moléculas quelantes del hierro que facilitan su asimilación por la planta reduciendo el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (Boukhalfa y Crumbliss. 2002). Los sideróforos más abundantes sintetizados por los microorganismos son las enterobactinas, las micobactinas, las agrobactinas, los ferricromos, las pseudobactinas, las rizobactinas y las staphyloferrinas. Los sideróforos pueden también formar complejos estables con otros metales presentes en la rizosfera como Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, y Zn (Schalk *et al.* 2011). Se ha demostrado que la presencia de metales pesados induce la producción de sideróforos por las bacterias (Braud *et al.* 2009).

El resultado de la inoculación de plantas con PGPR presenta diferencias significativas en el contenido de pigmentos fotosintéticos en la parte aérea y de N, P y K, en la parte aérea y en raíces (Farzana *et al.* 2009). Otros estudios han demostrado que incrementa también los niveles de otros elementos minerales como el Ca, K, Fe, Cu, Mn y el Zn de las plantas a través de la estimulación de la bomba de protones ATPasa (Sheng *et al.* 2008, Glick *et al.* 2007, Mantelin y Touraine. 2004).

Estudios recientes han demostrado que la inoculación con PGPR, en concreto *Acinetobacter calcoaceticus* incrementa el contenido en clorofila y por lo tanto, la actividad fotosintética en especies monocotiledóneas (*Lemna minor* o lenteja de agua) y dicotiledóneas (*Lactuca sativa* o lechuga), especies filogenéticamente distantes. De este modo, se mejora la nutrición autótrofa de las plantas inoculadas (Suzuky *et al.* 2014).

### 1.3.3.2 Estimulación del crecimiento

Se ha demostrado que las bacterias de la rizosfera producen fitohormonas (Tabla 7), que regulan fenómenos fisiológicos de la planta. Las hormonas producidas por las rizobacterias inducen el aumento en el crecimiento de la planta, lo que conlleva un incremento global en la productividad (Dobbelaere *et al.* 2003, Sheng y He. 2008, Glick *et al.* 2007, Spaepen *et al.* 2009).

Especies de *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, etc, han adquirido la capacidad de producir la auxina ácido indolacético IAA (Basharat *et al.* 2009, Mehboob *et al.* 2009, Taiz y Zeiger. 2006).

Las fitohormonas se engloban en cuatro grupos principales: auxinas, giberelinas, citoquininas y el etileno, aunque existen otras como el ácido abscísico o el jasmonato que también ejercen papeles muy importantes en el ciclo vegetativo de las plantas. Las PGPR son productoras de auxinas, giberelinas y citoquininas (Kloepper *et al.* 2007). Se ha observado que las citoquininas producen la elongación de las raíces, la división celular, el alargamiento de las células y el incremento de la superficie de las raíces (Salamone *et al.* 2005).

**Tabla 7. Producción de fitohormonas por PGPR (Modificado de García Fraile et al. 2012).**

Hormona	PGPR	Planta huésped
IAA	<i>Aeromonas veronii</i>	Arroz
	<i>Agrobacterium</i> sp.	Lechuga
	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	Lechuga
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Trigo
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Rábano
	<i>Comamonas acidovorans</i>	Lechuga
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Arroz
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rábano
Citoquininas	<i>Paenibacillus polymixa</i>	Trigo
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soja
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Colza
Giberelinas	<i>Bacillus</i> sp.	Aliso

### 1.3.3.3 Superación de situaciones de estrés

El etileno actúa fisiológicamente como una fitohormona y es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas, pero cuando la concentración es alta ejerce un efecto negativo en el desarrollo como la inhibición de la elongación radicular o la inducción de la defoliación, entre otros procesos celulares. En este sentido, algunas PGPR ejercen una importante acción que consiste en la síntesis de la enzima ACC desaminasa que hidroliza el ACC, precursor del etileno. De esta manera, se reduce la producción de etileno por la planta, lo cual provoca que siga creciendo bajo condiciones de estrés biótico o abiótico (Dobbelaere. 2003, Glick et al. 2007, Nadeem et al. 2007, Contesto et al. 2010, Arshad et al. 2008, Govindasamy et al. 2008).

La enzima ACC desaminasa cataliza la reacción con el precursor del etileno el ACC, produciendo amoniaco y  $\alpha$ -cetobutirato, esta reacción fue descrita por primera vez por Honma y Shimomura en 1978 (Figura 11).

Existen numerosas publicaciones que demuestran que bacterias rizosféricas como *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* sintetizan ACC desaminasa (Ghosh y Kornfeld. 2004, Govindasamy et al. 2008, Duan et al. 2009). Se ha observado en plantas de tomate inoculadas con *Achromobacter piechaudii* bajo estrés hídrico y salino, un incremento en el peso fresco y seco frente a las no inoculadas (Mayak et al. 2004). El mismo ensayo se realizó utilizando *Pseudomonas asplenii* con el gen de la ACC desaminasa inoculando semillas de colza (*Brassica napus*), y se observó un incremento en el peso seco tanto de la raíz como de la parte aérea de las plantas (Reed et al. 2005).

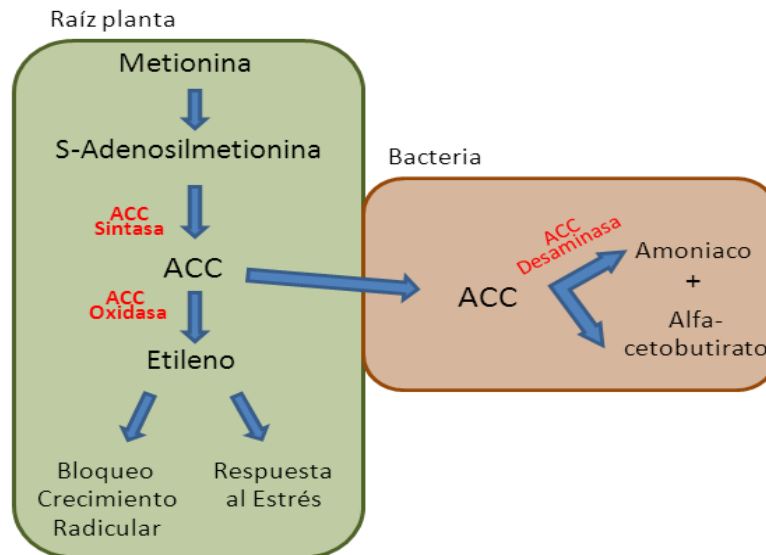


Figura 13. Actividad enzimática ACC desaminasa (Modificado Kang *et al.* 2010).

Diversos estudios han demostrado cómo plantas inoculadas con PGPR presentan una mejor respuesta al estrés hídrico (Zahir *et al.* 2008), al estrés producido por metales pesados (Kumar *et al.* 2009), estrés salino (Egamberdieva. 2008; Kaymak *et al.* 2009) y algunas otras condiciones ambientales desfavorables (Ahmad *et al.* 2008).

#### 1.3.3.4 Agentes de biocontrol

Se consideran agentes de biocontrol a los microorganismos capaces de reducir el efecto de los patógenos en las plantas. La utilización de estos productos puede aumentar la seguridad en los cultivos, disminuyendo el uso de pesticidas químicos y minimizando la aparición de resistencias a plagas y enfermedades. Los microorganismos que ejercen de biocontroladores pueden proteger contra patógenos de manera directa, mediante interacción de antagonismo con el patógeno y competencia por los nutrientes de la rizosfera. Por otra parte pueden inducir una respuesta sistémica en el hospedador y finalmente, pueden actuar de manera indirecta sintetizando metabolitos con acción antifúngica o antibacteriana y a través de la síntesis de enzimas líticas (Glick *et al.* 1995, Bloemberg y Lugtenberg. 2001, Persello Cartieaux *et al.* 2003).

Los agentes patógenos en plantas se dividen en dos tipos: necrotrofos, son aquellos que causan la muerte del huésped, y biotrofos que requieren de un huésped vivo para completar su ciclo vital (Hammond-Kossack y Jones. 2000). Las plantas están constantemente expuestas a un gran número de patógenos, pero en pocas ocasiones estos agentes consiguen desarrollar enfermedad.

La planta establece **mecanismos de defensa** similares frente a cualquier tipo de estrés biótico o abiótico. Por lo tanto, bien sea el ataque de un patógeno, una helada, una sequía, estrés por

salinidad o fitotoxicidad, etc, en todos estos casos la planta actúa reaccionando a ese ataque e iniciando su defensa. Para defenderse las plantas utilizan una combinación de barreras físicas y químicas que se establecen después de la infección (Yanni *et al.* 1997; Jones y Dangl. 2006) (Figura 14).

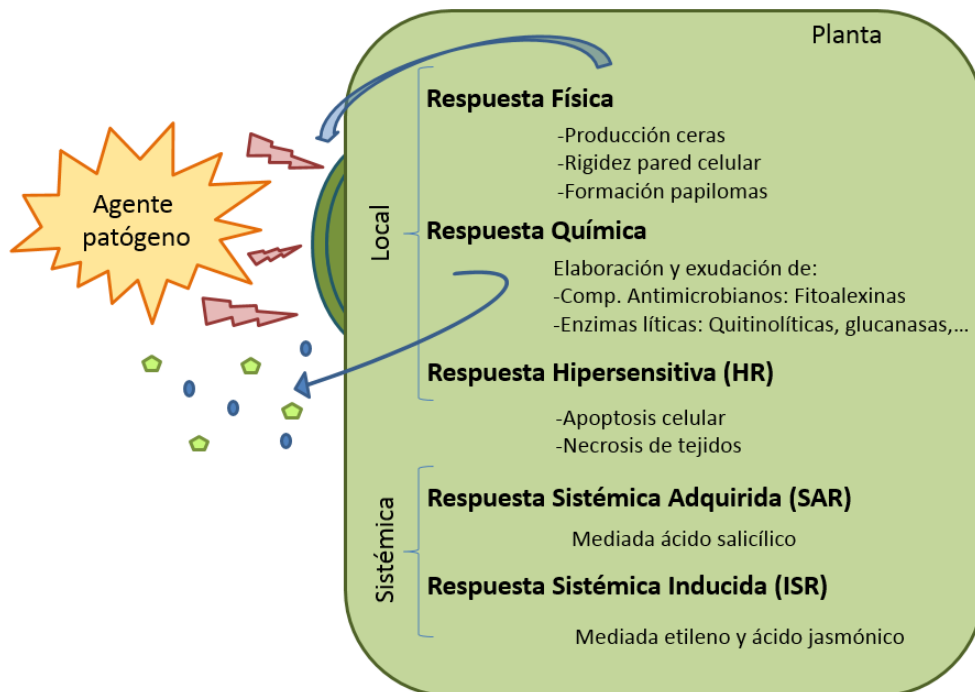


Figura 14. Principales mecanismos de defensa en plantas.

En cuanto a la **respuesta física**, ésta puede consistir en la formación de capas de cera, lípidos de la cutícula y de una mayor rigidez de la pared celular (Reina-Pinto y Yephremov. 2009). Además se ha demostrado que en ciertos casos se produce la formación de papilomas, los cuales están formados por compuestos estructurales como la calosa (Kloek *et al.* 2001)

La activación de la **respuesta química** de la planta produce la síntesis de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas (Veronese *et al.* 2006, Habib y Fazili. 2007) o la síntesis de metabolitos secundarios (Ahuja *et al.* 2012). También forma parte de los mecanismos de defensa la elaboración de enzimas líticas, como enzimas quitinolíticos y de  $\beta$ -1,3-glucanasas que destruyen la pared celular de los hongos patógenos *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, etc (Gupta. 1995, Quecine. 2008).

La siguiente barrera que encuentra el patógeno es el mecanismo de **respuesta hipersensitiva (HR)** y consiste en el rápido colapso que se establece por las células que sufren una muerte programada tras el ataque de un patógeno. Precede a la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y a la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), respuestas sistémicas de resistencia de la planta que

## Introducción

son activadas por ciertas moléculas de los microorganismos denominadas como elicitores (Berg. 2009).

La **Respuesta Sistémica Adquirida (SAR)** se activa de manera local y produce una respuesta sistémica tras la infección de la planta por patógenos que producen necrosis celular. A parte del daño por patógenos virus, bacterias y hongos, también se puede advertir la protección después de un ataque de artrópodos, un daño mecánico o después del contacto con algunos químicos (Lugtenberg y Kamilova. 2009).

La muerte celular en la planta produce la síntesis de las proteínas reguladoras PR (*Pathogenesis-related*), como NPR1/NIM y factores transcripcionales (TGAs). Estas proteínas son controladoras de la expresión de genes de defensa en los ataques por microorganismos y median la activación de la respuesta SAR produciendo un incremento endógeno, local y sistémico de ácido salicílico (Kloeck *et al.* 2001). La aplicación exógena de ácido salicílico sobre la superficie de una planta es capaz de inducir una respuesta de defensa similar a la activada en la SAR. Este mecanismo de defensa confiere resistencia frente a una segunda infección (Lee y Hwang. 2006).

Al igual que la SAR, la **Resistencia Sistémica Inducida (ISR)** es una resistencia sistémica, de amplio espectro (virus, bacterias, hongos) y duradera. Diversos estudios han demostrado que la ISR puede ser inducida por bacterias no patógenas y también por PGPR. Este tipo de resistencia depende de las rutas reguladas por las hormonas etileno y ácido jasmónico. Se ha demostrado que algunos PGPR inducen la expresión de genes de defensa relacionados con la ruta del jasmónico mediante la producción de elicitores. Los elicitores son polisacáridos de la pared celular, flagelos, ácido salicílico, antibióticos, sideróforos, compuestos orgánicos volátiles, etc; producidos por bacterias rizosféricas, y constituyen un importante mecanismo de activación de rutas de defensa de la planta (Ping y Boland. 2004, Berg. 2009, Ramos Solano *et al.* 2008). Esto supone una gran ventaja, pues se produce un efecto sinérgico entre el PGPR y la planta frente a agentes dañinos (Zamioudis y Pieterse. 2012).

Además, las bacterias con actividad PGPR presentan también una acción indirecta, como la producción de sideróforos comentada anteriormente, debido a que quelan el hierro retirándolo a los patógenos, obligándoles así a competir por nutrientes y por el nicho, la rizosfera. Asimismo, sintetizan compuestos antifúngicos, antibióticos y enzimas que lisan paredes celulares reduciendo el crecimiento de patógenos (Glick *et al.* 1995, Bloemberg y Lugtenberg. 2001, Persello Cartieaux *et al.* 2003).

Las PGPR son potenciales agentes de biocontrol multifuncionales con un gran futuro en agricultura, debido a que producen compuestos tóxicos contra agentes patógenos, sustancias antibacterianas, enzimas, antibióticos, metabolitos, compuestos volátiles..., producen

quimiotaxis, activan las rutas defensivas de las plantas y compiten por los nutrientes del suelo (Babalola. 2010).

### 1.3.3.5 *Rhizobium* como PGPR

Los nódulos que aparecen en las raíces de las leguminosas en presencia de rizobios son unos órganos especializados de los tejidos radiculares de la planta para albergar a bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> (Taiz y Zeiger. 2006). Algunos autores engloban a todas las bacterias capaces de nodular leguminosas en el género *Rhizobium* (Frank. 1889) y en la familia *Rhizobiaceae* (Conn. 1938). El nombre "*Rhizobium*" enfatiza en la importancia agronómica de las bacterias de los nódulos de las raíces (*rhiza*: raíz, *bius*: vida).

En el orden *Rhizobiales* se adscriben la mayor parte de los rizobios descritos en la actualidad. Es un grupo fenotípicamente heterogéneo de bacterias aerobias, de forma bacilar y Gram negativas, relacionadas por la secuencia del gen ribosómico 16 S. Los microorganismos incluidos en el género *Rhizobium* son bacilos, Gram negativos, aerobios, no esporulados y móviles (con 1-6 flagelos peritricos, polares o subpolares) (Figura 15). Este grupo de bacterias se engloban en 5 géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, dentro de las  $\alpha$ -Proteobacteria (phylum *Proteobacteria*, dominio Bacteria) (García-Fraile. 2008). En medio de cultivo sólido con manitol y extracto de levadura forma colonias de 2-4 mm de diámetro tras 5 días de incubación, circulares, convexas, semitransparentes y brillantes (Kuykendall. 2005).

<b><u>Clasificación de <i>Rhizobium</i></u></b>	
Dominio	Bacteria
Filo	<b><i>Proteobacteria</i></b>
Clase	<i>Alfaproteobacteria</i>
Orden	<i>Rhizobiales</i>
Familia	<i>Rhizobiaceae</i> (Conn, 1938)
Género	<b><i>Rhizobium</i></b> (Frank, 1889)
Especie tipo	<b><i>Rhizobium leguminosarum</i></b>




Figura 15. Clasificación de la cepa tipo del género *Rhizobium* y su imagen al microscopio electrónico.

En 1984, Jordan separó las especies de rizobios de crecimiento lento subclassificándolas en *Bradyrhizobium*, mientras las de crecimiento rápido se englobaron en una única especie, *Rhizobium leguminosarum* aunque posteriormente se incluyeron nuevas. El gen ribosómico del 16S rRNA ha sido una herramienta muy útil en la filogenia de las bacterias de este género, pero a día de hoy sabemos que presenta limitaciones en la diferenciación de especies próximas de rizobios (Valverde *et al.* 2006, Ramirez-Bahena *et al.* 2008). Posteriormente se han ido utilizando

## Introducción

genes como *rrs*, *recA* y *atpD*, para afianzar los estudios filogenéticos en este género, recientemente se ha demostrado que el gen *celC* que codifica para la celulasa también se puede utilizar como marcador filogenético (Robledo *et al.* 2011).

El género *Rhizobium* actualmente con 16 especies es el que más especies de rizobia incluye y presenta una gran ventaja para su utilización como PGPR, su seguridad. Debemos tener en cuenta que nuestra alimentación es la base de la salud humana y en el momento de introducir microorganismos a los vegetales, es imprescindible tener clara su total inocuidad. En este caso, la seguridad que proporciona este género ha sido probada durante décadas en la inoculación de leguminosas (García-Fraile *et al.* 2012).

A pesar de que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es la más estudiada, a día de hoy se conoce que estos microorganismos también colonizan las raíces de plantas no leguminosas presentando diversas acciones que estimulan el crecimiento de la planta incrementando la producción de los cultivos (Peña y Reyes. 2007, García-Fraile *et al.* 2012 Flores-Félix *et al.* 2013).

*Rhizobium* muestra **efecto PGPR** mediante distintas acciones (Tabla 8), como por ejemplo la capacidad de solubilizar fosfatos y la producción de fitohormonas (Yanni *et al.* 2001). La mayor parte de las cepas PGPR descritas que promueven el crecimiento en plantas pertenecen a biovariedades *phaseoli* y *trifolii* de *Rhizobium leguminosarum* (Chabot *et al.* 1996, Yanni *et al.* 2001, Noel *et al.* 1996, Antoun *et al.* 1998). Sin embargo, se han descrito otras especies de rizobios como *Mesorhizobium mediterraneum* con capacidad PGPR en cebada (Peix *et al.* 2001).

Las bacterias del género *Rhizobium* tienen la capacidad de producir diferentes tipos de polisacáridos. Dentro de los polisacáridos rizobianos, los **lipopolisacáridos LPS** se encuentran en la cara externa de la membrana celular y los cicloglucanos se encuentran en el espacio periplásmico. Los **exopolisacáridos EPS**, caracterizan este género y son compuestos formados por carbohidratos secretados al medio a través de la pared celular; éstos a su vez pueden ser de carácter ácido o neutro, y se encuentran libres en el medio o débilmente asociados a la bacteria. Se han descrito en *Sinorhizobium* **polisacáridos capsulares KPS** que permiten simbiosis normales en ausencia de otros exopolisacáridos. Los lipopolisacáridos de *Rhizobium etli* inducen resistencia sistémica en raíces de patata contra *Globodera pallida* (Reitz *et al.* 2000). La producción de polisacáridos por los rizobios favorece su adherencia a las raíces de las plantas (Mehboob *et al.* 2009).

Especies de bacterias del género *Rhizobium* han sido evaluadas en laboratorio por sus propiedades PGP (Tabla 8). La producción de la auxina ácido indolacético se ha demostrado en numerosas cepas de este género, en concreto se ha descrito la producción de esta fitohormona por *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifolii* y *R. lupini*. A su vez, se ha comprobado la producción de



otras hormonas vegetales, citoquininas y giberelinas (Hoflich *et al.* 1994, Yanni *et al.* 2001, Noel. 2009). El IAA tiene la capacidad de inducir la producción de raíces adventicias y un mayor número de pelos radiculares, aumentando la superficie de absorción de la raíz (Ribaudó *et al.* 2006).

Otro mecanismo PGPR es la **producción de sideróforos** y se ha observado tanto en diferentes especies de rizobios como en diferentes biovariedades *phaseoli*, *trifolii* y *viciae* de *Rhizobium leguminosarum* y en *R. tropici* (Biswas *et al.* 2000, García Fraile *et al.* 2012).

**Tabla 8. Rizobios PGPR en no leguminosas (Modificado de García-Fraile *et al.* 2012).**

<b>Especie de <i>Rhizobium</i></b>	<b>Planta</b>	<b>Mecanismos PGP "in vitro"</b>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Maíz	Solubilización de Fósforo, IAA
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Lechuga	Solubilización de Fósforo, IAA
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifoli</i>	Arroz	Solubilización de Fósforo, IAA
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Colza, lechuga	IAA
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Tomate, pimiento	Sideróforos, IAA
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifoli</i>	Tomate, pimiento	IAA
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Cebada	Solubilización de Fósforo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Rábanos	Sideróforos

Diversos estudios han demostrado que algunas cepas de rizobios son capaces de **solubilizar fósforo** procedente de formas no asimilables (orgánicas e inorgánicas) a formas asimilables por las plantas, lo cual produce una estimulación del crecimiento por ser un nutriente esencial de la planta (Abd-Alla. 1994, Antoun *et al.* 1998, Yanni *et al.* 2001, Mehboob *et al.* 2003, Tajini *et al.* 2012).

En la **síntesis de la enzima ACC desamina** que interviene inhibiendo la síntesis del etileno, las plantas inoculadas con *Rhizobium* presentan un mayor crecimiento radicular y se mejora la resistencia a situaciones de estrés producidas por ataques de patógenos, salinidad, metales pesados y condiciones de anoxia en suelos encharcados (Mehboob *et al.* 2003).

Se han realizado numerosos estudios de distintas cepas de *Rhizobium* en una amplia diversidad de plantas hospedadoras no leguminosas (Tabla 9) encontrándose resultados muy favorables respecto al incremento de biomasa. Los rizobios intervienen mejorando el proceso de nutrición vegetal del hospedador mediante mecanismos de adquisición de nutrientes del suelo (P, K, Mg, Ca, Zn, Na y Mo), modulando la arquitectura radicular y aumentando la biomasa de la planta (Yanni *et al.* 2001). Recientes estudios han demostrado que *Rhizobium leguminosarum* incrementa el contenido de N y P en las partes comestibles de los cultivos *Lactuca sativa* (lechuga) y *Daucus carota* (Zanahoria) (Flores-Félix *et al.* 2013).

Tabla 9. Investigaciones de Rizobios en diferentes cultivos y principales acciones: Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) o Estimulación del Crecimiento (PGPR).

PGPR	Planta	Resultado de la inoculación	Referencia	Acción
<i>Bradyrhizobium</i> MRM6	<i>Vigna radiata</i> L (Frégoles)	Incremento de todos los parámetros de crecimiento cuando se inocula con herbicidas.	Ahemad y Khan. 2012 Ahemad y Khan. 2011a	FBN
<i>Rhizobium</i> strain MRL3	<i>Lens esculentus</i> (Lentejas)	Incremento significativo del P y N en la raíz en los brotes, aumento de la cosecha y proteína en el grano.	Ahemad y Khan. 2011b Ahemad y Khan. 2010	FBN
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (vigna) RM8	<i>Vigna radiata</i> L (Frégoles)	Aumento del número de nódulos, la producción de grano y el contenido de nitrógeno de los granos, semillas y brotes.	Wani <i>et al.</i> 2007a	FBN
<i>Rhizobium</i> sp. RP5	<i>Pisum sativum</i> (Guisante)	Aumento de la material seca, el número de nódulos, el N en raíz, brotes y aumento de la producción (grano).	Wani <i>et al.</i> 2007b	FBN
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	Mejora la translocación del Cu y Fe desde la raíz a los brotes.	Carrillo-Castaneda <i>et al.</i> 2003	FBN
<i>Rizobium leguminosarum</i>	<i>Lactuca sativa</i> (lechuga) y <i>Daucus carota</i> (zanahoria)	Aumento en la biomasa total de ambos cultivos, aumento del peso seco de brotes y raíces, e incremento de la absorción de N y P en partes comestibles de ambas especies vegetales.	Flores-Félix <i>et al.</i> 2013	PGPR
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Zea mays</i> (Maíz)	Mejor resistencia a estrés hídrico y salino	Francini <i>et al</i> 2013	PGPR
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	Aumento tamaño de los frutos, aumento del crecimiento global de la planta, e incremento de nutrientes N, P, K y Mg.	García-Fraile <i>et al.</i> 2012	PGPR
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Aumento de lo biomasa total e incremento en la eficiencia de absorción del P, K, Mg, Ca, Zn, Na y Mo.	Yanni <i>et al.</i> 2001	PGPR
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i> bv <i>ciceri</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (cebada)	Aumento del tamaño de los granos de semillas	Peix <i>et al.</i> 2001	PGPR
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Incremento en el crecimiento de brotes y raíces	Yanni <i>et al.</i> 1997	PGPR
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	<i>Triticum spp.</i> (trigo) <i>Zea mays</i> (maíz)	Estimulación del crecimiento en las planta, aumento biomasa total.	Hoflih <i>et al.</i> 1995	PGPR
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Zea mays</i> (maíz)	Incremento tamaño y peso de las semillas.	Chabot <i>et al.</i> 1996	PGPR

Un factor importante para la idoneidad de las especies de *Rhizobium* para su utilización como inoculante, es la supervivencia en el suelo en competencia directa con otros microorganismos nativos. Cuando se ha realizado la incorporación de nuevas especies de rizobios en lugares donde anteriormente no existían, se han obtenido buenos resultados en especies que nodulan leguminosas.

Los rizobios pueden colonizar las raíces de diversas plantas no leguminosas como el maíz, el arroz, el pimiento, el tomate y muchos otros vegetales, considerándose por este motivo buenos candidatos para su utilización como biofertilizantes (Peña y Reyes. 2007, García-Fraile *et al.* 2012). Estudios recientes con *Rhizobium leguminosarum* en *Lactuca sativa* (lechuga) y *Daucus carota* (zanahoria) han demostrado que coloniza activamente la rizosfera produciendo un aumento en el crecimiento de la planta y en el contenido de N y P de las partes comestibles en ambos vegetales, convirtiéndose en un potencial biofertilizante en plantas no leguminosas (Flores-Félix *et al.* 2013).

## 1.4 Los biofertilizantes

Los biofertilizantes contienen microorganismos vivos que promueven el crecimiento y mejoran el nivel de nutrientes de la planta (Vessey. 2003). En la actualidad, numerosas especies de bacterias de la rizosfera se utilizan comercialmente como biofertilizantes. Las relaciones entre los biofertilizantes con PGPR y los cultivos pueden producirse a nivel rizosférico o endofítico (Malusá *et al.* 2012).

Los primeros inoculantes producidos fueron formulados con rizobios y se destinaron a la producción de leguminosas. Las primeras formulaciones fueron cultivos líquidos o suspensiones líquidas de *Rhizobium* que se aplicaban en la semilla. Se empezaron a incorporar aditivos que favorecían la adhesión y la viabilidad de las bacterias. Con posterioridad aparecieron soportes sólidos y en los años 60, investigadores australianos desarrollaron la tecnología de producción de inoculantes de *Rhizobium* que actualmente, salvo variaciones, se sigue en todo el mundo. Esta tecnología ha servido de modelo para la producción de otras bacterias para biotecnología agrícola, distintas de *Rhizobium* (Bedmar *et al.* 2006).

Los inoculantes que contienen bacterias promotoras del crecimiento se utilizan aplicados recubriendo las semillas de los cultivos. Las funciones principales de los protectores bacterianos son adherir la bacteria a la semilla, proteger de la desecación celular y nutrir a las bacterias para mantener su metabolismo en el período transcurrido entre la inoculación y la germinación de la planta. La función de los soportes es la de proporcionar vehículos estériles para facilitar la aplicación de los inoculantes (Albareda *et al.* 2008).

## **1.5 Integración de los fertilizantes minerales con los microorganismos beneficiosos de la rizosfera**

La agricultura actual requiere de la integración de los diferentes sistemas productivos para el mantenimiento de la productividad y la conservación del medioambiente (Figura 16). Las principales acciones de las PGPR se resumen en sintetizar determinados compuestos para la planta, facilitar la absorción de nutrientes del suelo solubilizando fosfatos inorgánicos y otros nutrientes, prevenir a las plantas de enfermedades, estabilizar los agregados e incrementar el contenido en materia orgánica y mejorar la estructura del suelo (Hayat *et al.* 2010).

Tradicionalmente los inoculantes se han utilizado como estimuladores del crecimiento y como biocontroladores; sin embargo, debido al gran efecto de los mismos en la absorción de nutrientes, se abre un nuevo campo de investigaciones. Diversos estudios han demostrado que el uso de inoculantes mejora la eficiencia en la absorción de los nutrientes aportados por los fertilizantes químicos (Adesemoye y Kloepper. 2009).

Los inoculantes a base de microorganismos incluyen tres grandes grupos: las micorrizas arbusculares, las PGPR y los rizobios fijadores de nitrógeno en simbiosis (Pérez-Montañaño *et al.* 2013). Estudios basados en los beneficios de las bacterias PGP han concluido una mayor mejora en los resultados obtenidos utilizando mezclas de microorganismos que en los microorganismos utilizados por separado (Berg. 2009). *Rhizobium* puede ser considerado el género más conocido de bacterias beneficiosas para las plantas y el más importante en la producción de biofertilizantes (Pérez-Montañaño *et al.* 2014).

El crecimiento de las raíces de las plantas es muy sensible a los niveles de hormonas endógenas y a las concentraciones de los nutrientes, especialmente el N, P y el K. Se ha demostrado que los PGPR incrementan el peso de las raíces de las plantas de trigo, por lo que la combinación de dosis adecuadas de fertilizantes químicos con PGPR ayudan a conseguir el máximo beneficio en términos de un mayor crecimiento vegetal (Shaharoono *et al.* 2010).

Los beneficios de la inoculación con rizobacterias de los cultivos son muy diversos y muchos se han descrito en apartados anteriores. A modo de resumen, El-Howeity y Asfour en 2012 demostraron que la aplicación de PGPR incrementa significativamente el peso de las plantas de colza, pero también el peso de las semillas. Así mismo, Alamri y Mostafa en 2009 comprobaron que en los granos de trigo cosechado se ha incrementado el contenido en N, P, K y Ca y disminuido el contenido en Na en comparación con los tratamientos sin inocular.



**Figura 16. Importancia de la combinación de los fertilizantes minerales con PGPR para mejorar la productividad de los cultivos.**

Estudios recientes han demostrado como la utilización combinada de microorganismos PGPR junto a fertilizantes minerales incrementa la concentración en el grano de Fe, Zn, Mn y Cu, al igual que ocurre con el N, P y K (Dawwam *et al.* 2013). Por lo tanto la integración del uso de PGPR con fertilizantes minerales puede suponer una opción relativamente barata y muy interesante para incrementar la concentración de nutrientes en el grano de cereal (Rana *et al.* 2012).

En cuanto a los niveles de fertilizantes a aplicar en los cultivos para el uso de las rizobacterias, se ha demostrado que la inoculación de PGPR, puede mejorar eficazmente el crecimiento de las plantas y el rendimiento en cosecha en plantas de maíz, incluso a niveles óptimos de fertilización nitrogenada en el suelo (Shaharoon *et al.* 2006).

Es conveniente integrar estrategias para el mantenimiento del nivel de nutrientes en el suelo, y según se ha demostrado, el uso de microorganismos constituye una herramienta eficaz para incrementar el nivel de macro y micronutrientes absorbidos por las plantas. Para diferenciar si dicho aumento proviene de nutrientes del suelo o del fertilizante, se ha marcado el nitrógeno del fertilizante con el isótopo  $^{15}\text{N}$  (Adesemoye *et al.* 2010). Finalmente se ha demostrado que el incremento en el nitrógeno absorbido proviene del fertilizante. Por lo tanto, las PGPR presentan potencial para incrementar el uso eficaz de los fertilizantes, los cuales se aplican regularmente en el campo. Estos beneficios se pueden dividir en dos futuras perspectivas: primero, PGPR incrementan la cantidad de nutrientes absorbido y se rentabiliza su aplicación y en segundo

lugar, se reduce la cantidad de nitrógeno lixiviado durante todo el crecimiento de los cultivos y después de la cosecha (Adesemoye y Kloepper. 2009).

### 1.6 Huella de carbono en los cultivos de cereales

El término de la huella de carbono deriva de la idea de “huella ecológica” publicada por Rees (1992). Posteriormente Wackernagel (1994) definió la huella de carbono como la cantidad de gases efecto invernadero que son liberados a la atmósfera por la acción del hombre. Más adelante Wielmann y Minx (2008) definieron la huella de carbono como “la medida de las cantidades totales de dióxido de carbono emitidas tanto directa como indirectamente por una actividad o son acumuladas en las etapas del ciclo de vida de un producto”. En el 2011, la definición se extendió a “la cantidad total de gases efecto invernadero (GEI) asociados con un producto o servicio expresados en equivalentes de CO<sub>2</sub> (Gan *et al.* 2011).

Por lo tanto, los GEI se refieren a CO<sub>2</sub> equivalentes (CO<sub>2</sub> eq), que incluye los seis gases de efecto invernadero identificados en el Protocolo de Kioto (Yang *et al.* 2014):

- Dióxido de carbono CO<sub>2</sub>
- Metano CH<sub>4</sub>
- Óxido nitroso N<sub>2</sub>O
- Hidrofluorocarbonos (HFC)
- Perfluorocarbonos (PFC)
- Hexafluoro de azufre (SF<sub>6</sub>)

Todas las actividades económicas, en la medida en que utilizan energía a lo largo de sus cadenas de producción son responsables de una mayor o menor cantidad de gases efecto invernadero (GEI), incluida la actividad agraria (Altuna *et al.* 2011). En concreto, la agricultura emite sobre el 14 % del global de GEI procedente de la acción del hombre. La huella de carbono se calcula evaluando las emisiones de gases efecto invernadero en las distintas etapas del cultivo y se contabilizan las emisiones de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), de metano (CH<sub>4</sub>) y de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Grunberg *et al.* 2010).

Gran parte de las emisiones de CO<sub>2</sub> equivalente en la producción de cereal están relacionadas con la fertilización (Gan *et al.* 2011). Sin embargo, se ha demostrado que la huella de carbono es mayor en el tipo de agricultura ecológica que en la agricultura convencional y la integrada. Según este estudio las emisiones de CO<sub>2</sub>/t de grano son similares tanto en el tipo de producción convencional como en la integrada, pero comparando las emisiones del tipo de producción convencional con la producción ecológica se estiman las siguientes proporciones 1:1,53 en trigo,

1:1,47 en colza y 1:1,2 en el caso del girasol, siendo el número mayor correspondiente a la producción ecológica (Jejcic *et al.* 2014).

Las principales emisiones derivadas de la fertilización son las emisiones de N por volatilización ( $\text{NH}_4$ ) y desnitrificación ( $\text{N}_2$ ) (Andrews y Lea, 2013). Un factor importante de emisiones de  $\text{CO}_2$  a tener en cuenta en el cultivo de cereal es la descomposición de la paja y las raíces que suponen el 25 % de las emisiones totales (Gan *et al.* 2011).

En cuanto al tipo de emisiones, las emisiones directas representan el 60 % del total y proceden del gasóleo y del suelo, mientras que las emisiones indirectas proceden de la fabricación y el transporte de las materias primas acumulando el 40 % restante, siendo el fertilizante nitrogenado significativamente más importante (Altuna *et al.* 2011).

En la producción de cereales para grano el agricultor es el responsable del cultivo y de gestionar tareas como la siembra, la utilización de fertilizantes y fitosanitarios, el sistema de riego y la utilización de gasoil y aceites de tractores, máquinas y vehículos industriales.





## **2 Objetivos**



El objetivo general de la tesis es analizar el valor agronómico de los rizobios como biofertilizantes en cultivos extensivos de cereal. Para cumplir este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos concretos (Figura 17):

1. Pre-seleccionar en condiciones *in vitro* los rizobios con mayor expresión de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal.
2. Analizar la supervivencia y el efecto sobre la planta de las bacterias aplicadas al abono y en la semilla en suelo estéril
3. Conocer el efecto de un biofertilizante a base de rizobios cuando se aplican al abono o a la semilla, sobre el desarrollo vegetativo en trigo y en suelo real.
4. Selección de bacterias y dosis de las mismas en ensayos sobre planta en microcosmos en ausencia de abono.
5. Analizar el tipo de simbiosis que se produce entre la raíz del cereal y el microorganismo, por técnicas de microscopía.
6. Análisis del rendimiento en campo de cultivo de cereal debido al efecto de los biofertilizantes basados en rizobios.

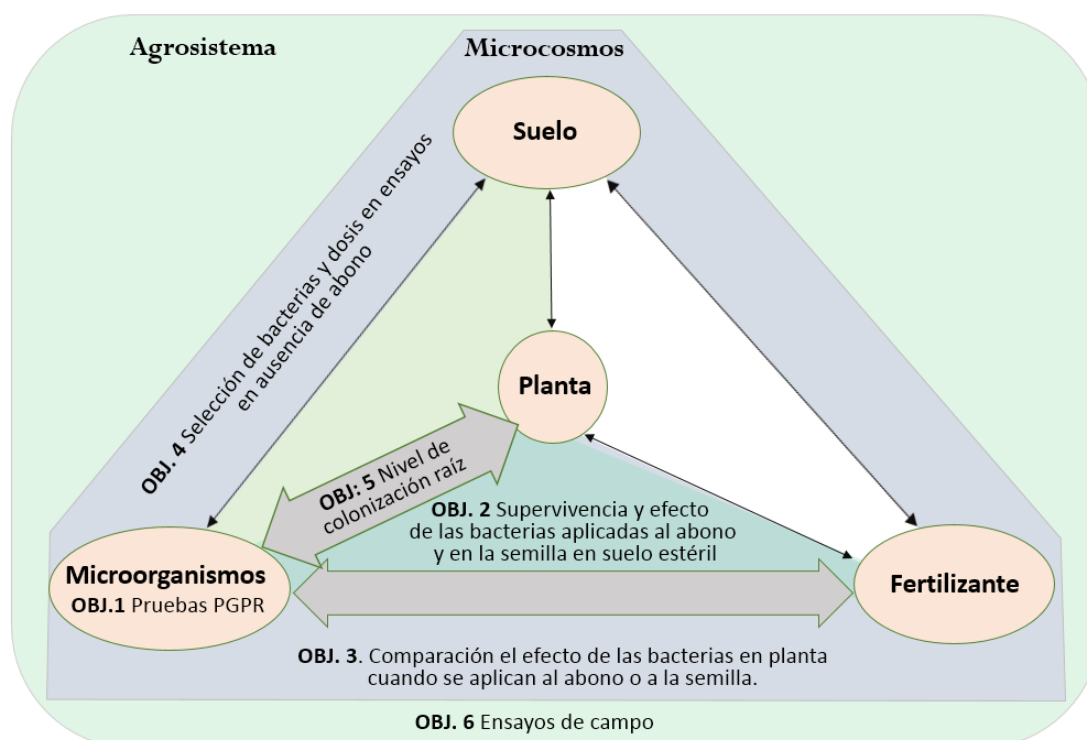


Figura 17. Resumen esquemático de los objetivos que han sido desarrollados en este trabajo.

## Plan de trabajo

Para desarrollar los objetivos planteados se realizó el plan de trabajo que se presenta en la Figura 18:

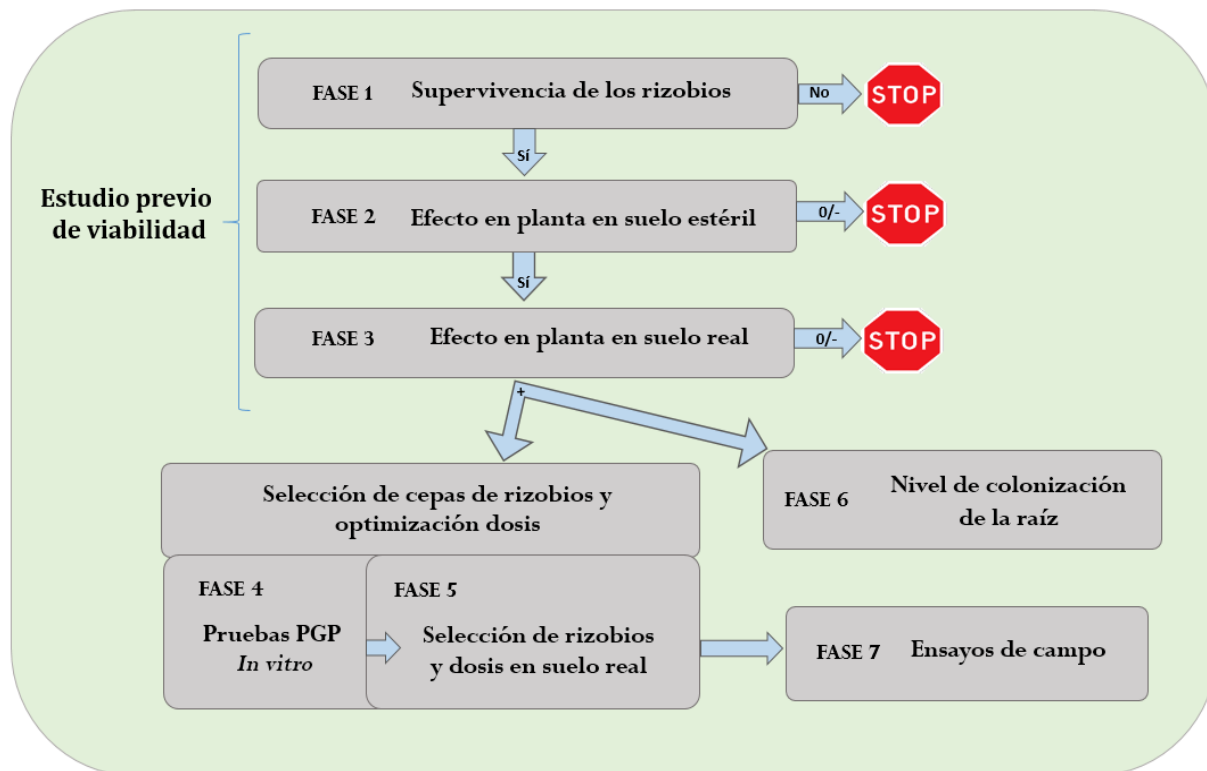


Figura 18. Esquema explicativo del plan de trabajo llevado a cabo con el fin de cumplir los objetivos planteados.

En el ensayo previo de viabilidad, el primer paso abordado fue comprobar si una cepa del género *Rhizobium* seleccionada por su potencial interés como PGPR, sobrevive y puede llegar al suelo de manera activa cuando se aplica recubriendo los gránulos de fertilizantes minerales, ya que en principio las condiciones que se generan pueden resultar negativas para las bacterias. Este ensayo se realizó sobre suelo estéril y se mantuvieron las condiciones gnotobióticas, lo que facilita el análisis de la supervivencia de la bacteria empleada como inoculante en el suelo. En el mismo ensayo se analizó si además de sobrevivir las bacterias se produce un efecto estimulador del crecimiento de las plantas de trigo. Al haber obtenido respuestas positivas a las dos cuestiones indicadas, el ensayo previo de viabilidad continuó sobre suelo real, es decir no estéril, para analizar si en condiciones de competencia con otros microorganismos del suelo, el efecto promotor del crecimiento vegetal se mantiene.

Al alcanzar una respuesta positiva de la planta al tratamiento, no solamente en suelo estéril sino también en condiciones de suelo real, la siguiente fase de la investigación se planteó para

responder a la pregunta ¿alguna otra cepa de rizobios de la colección de la ULE puede superar a la cepa utilizada? Para ello se realizó un *screening* de 47 cepas de la colección de rizobios de la ULE mediante pruebas *in vitro* para determinar su potencial efecto PGP. Las pruebas realizadas fueron: producción de ácido indolacético, actividad ACC desaminasa, solubilización de fosfato y producción de sideróforos. Con los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* se seleccionaron cuatro cepas potencialmente interesantes como PGPR. A continuación, para comprobar el efecto *in vivo* sobre plantas de cebada, de las cepas seleccionadas, se llevó a cabo un microcosmos. El diseño experimental de dicho microcosmos se estableció de tal manera que permitiese simultáneamente optimizar la dosis a la que hay que aplicar los microorganismos para alcanzar el máximo efecto promotor del crecimiento vegetal.

Además se ha planteado una prueba de laboratorio para conocer el nivel de interacción que se establece entre las raíces de plantas de cebada y los microorganismos seleccionados, para averiguar si dicho efecto se obtiene a través de una colonización a nivel rizosférico o endofítico.

Como corresponde a una Tesis Doctoral en agronomía, las cepas que mejores resultados dieron en los ensayos en microcosmos, fueron analizadas en ensayos de campo.

Finalmente, al desarrollar en la Tesis Doctoral una investigación finalista, se han realizado los análisis económicos y ambientales, en los cuales se evalúa como repercute la aplicación de los fertilizantes mejorados en la economía de los agricultores y en el medio ambiente mediante la reducción de la huella de carbono en cultivos de cereal.



## **3 Materiales y Métodos**





### 3.1 Estudio previo de viabilidad

#### 3.1.1 Microcosmos en suelo estéril

Objetivo 2, Fase 1 de la investigación

El objetivo de este ensayo fue analizar si los microorganismos soportan las condiciones generadas en el proceso de disolución del gránulo de fertilizante y analizar el posible efecto del inoculante en las primeras fases de desarrollo del trigo desde germinación hasta estadio de 3 hojas. Se trabajó en suelo esterilizado con el fin de poder identificar fácilmente la presencia en el suelo de los microorganismos inoculados, evitando posibles interferencias con los microorganismos nativos del suelo.

##### 3.1.1.1 Diseño experimental del ensayo en cámara de cultivo

El diseño experimental del ensayo se estructuró en bandejas rectangulares de plástico de 32 x 21 x 7 cm con 2 filas de 15 plantas, constituyendo dichas bandejas las unidades experimentales del ensayo. La separación entre filas fue de 19 cm y entre plantas dentro de la fila de 0,9 cm, equivalente a una dosis de siembra de 200 kg / ha. Las semillas se sembraron a una profundidad de 1,5 cm. Las bandejas donde crecieron las plantas fueron colocadas de dos en dos en un contenedor de 60 x 40 x 9 cm. El experimento se realizó en cámara de cultivo IBERCEX V-450-B bajo las siguientes condiciones 25 °C día / 14 °C noche, con 10 h luz / 14 h oscuridad y una humedad relativa del 65 % ± 5 % (Figura 19).

Las semillas de trigo utilizadas fueron de la variedad “Rudo” y la dosis de siembra fue de 200 kg / ha. La variedad Rudo pertenece a la especie *Triticum aestivum*, trigo blando de invierno de ciclo medio. Se aplicó un fertilizante complejo 15-35-0 + Zn <sup>(1)</sup> a una dosis de 0,9 g de abono por cada metro lineal equivalente a una dosis de 50 kg / ha.

Los riegos se aplicaron cada 4 días, con un volumen de 0,5 l por bandeja de agua destilada esterilizada. Se aplicaron 125 ml pulverizados sobre el suelo para disolver los granos de abono y se añadieron 375 ml a la bandeja contenedora para que fueran absorbidos por capilaridad. De esta manera el estado hídrico del suelo se mantuvo a capacidad de campo, evitando así la pérdida de microorganismos y nutrientes por lixiviación.

<sup>(1)</sup> Composición del fertilizante 15-35-0 + Zn: Nitrógeno total 15 % (2 % NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y 13 % NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Pentóxido de Fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) soluble en agua 28 % y en citrato amónico neutro 35 % y Zinc 0,5 %.

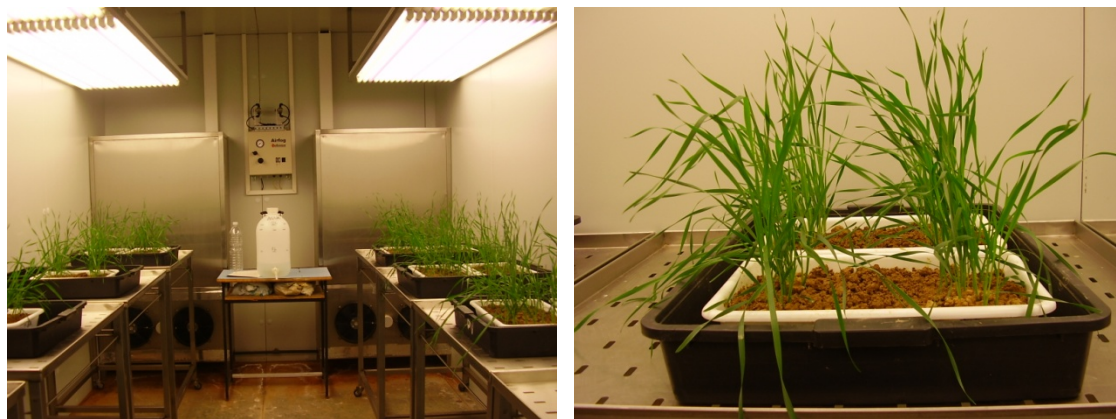


Figura 19. Ensayo sobre suelo esterilizado y en cámara de cultivo.

El suelo del ensayo procedió de Villada (Palencia) (42° 14'19,97'' N, 4° 58'15,82'' O, altitud 795 m) y fue esterilizado dos veces en autoclave durante 1 h a 120 °C. El análisis físico químico del suelo, una vez autoclavado, se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis del suelo utilizado en el ensayo de cámara de cultivo, después de la esterilización.

Análisis de suelo		
Textura	Arena (%)	24
	Limo (%)	42
	Arcilla (%)	34
	Clase textural (USDA)	D (Franco-Arcillosa)
pH		8,5
Carbonatos (% caliza)		6,28
Materia orgánica (%)		1,66
N. Total (%)		0,11
Relación C/N		8,55
Fósforo Olsen (mg/kg)		12,71
Cationes (cmol/kg)	Calcio	17,10
	Potasio	0,35
	Magnesio	1,23
	Sodio	0,15
CIC (cmol/kg)		10,71
Ologoelementos (mg/kg)	Cobre	0,59
	Hierro	6,55
	Manganeso	65,32
	Zinc	0,54
Conductividad (dS/m)		0,11

### 3.1.1.2 Tratamientos evaluados en ensayo en cámara de cultivo

Los tratamientos que fueron estudiados figuran en la tabla 11. Los microorganismos utilizados fueron la cepa de rizobio B4 y una cepa de *Burkholderia* sp., ambas aplicadas individualmente y en combinación al 50 %. En primer lugar, se realizaron tres tratamientos que consistieron en el recubrimiento de las semillas de trigo con turba inoculada con ambas cepas, tanto de manera individual, como con la mezcla, y siendo ésta la metodología de aplicación de los inoculantes comerciales en los cultivos. Los siguientes tratamientos recubriendo los gránulos del fertilizante con las cepas por separado y con la mezcla. Por último, se diseñaron tres tratamientos más en los cuales los microorganismos recubrieron las semillas con la turba inoculada y además, estos

tres tratamientos fueron abonados. Se incluyeron también un control negativo sin fertilizar y un control positivo fertilizado.

**Tabla 11. Tratamientos realizados en el ensayo sobre suelo esterilizado.**

Descripción del tratamiento	Código
Control sin fertilizar	C
Control fertilizado con 15-35-0+Zn	CF
Semilla recubierta con <i>Rhizobium leguminosarum</i> B4	S-R
Semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp	S-B
Semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	S-RB
15-35-0+Zn recubierto con <i>Rhizobium leguminosarum</i> B4	F-R
15-35-0+Zn recubierto con <i>Burkholderia</i> sp.	F-B
15-35-0+Zn recubierto con la mezcla de las dos cepas	F-RB
15-35-0+Zn y semilla recubierta con B4	F + S-R
15-35-0+Zn y semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp.	F + S-B
15-35-0+Zn y semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	F + S-RB

Cada bacteria fue producida de manera independiente. El cultivo puro de *Rhizobium leguminosarum* B4 fue producido inicialmente en medio sólido YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent. 1970) y posteriormente se inoculó en medio líquido para obtener el cultivo puro, en YMB (Yeast Mannitol Broth) (Tabla 12 izquierda) tras 5 días de incubación a 28 °C. En el caso de *Burkholderia* sp. se sembró inicialmente en medio TSA (Tryptic Soy Agar) (Mc. Faddin. 1985) y posteriormente en TSB (Tryptic Soy Broth) (Tabla 12 derecha) tras incubarse 3 días a 28 °C se obtuvo el cultivo puro. Ambos cultivos puros se prepararon a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC / ml (2,0 en el patrón de Mc. Farland).

**Tabla 12. Composición del medio YMA (izquierda) y TSA (derecha).**

Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g	Peptona de caseína	15,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g	Peptona de soja	5,0 g
NaCl	0,1 g	NaCl	5,0 g
Manitol	10,0 g	Agar	15,0 g
Extracto de levadura	0,2 g	Agua destilada	l
Agar	20,0 g		
Agua destilada	1,0 l		

A continuación esta suspensión de microorganismos fue aplicada al fertilizante o semilla, según el siguiente protocolo:

- Aplicación al fertilizante: Se aplicó una doble capa del cultivo puro de ambos microorganismos, mediante pulverización sobre los gránulos del fertilizante, que se encontraban en un disco rotatorio, y posteriormente se secaron con aire frío. La relación de caldo inoculante y fertilizante fue del 1 % v/p para cada una de las capas.

- Aplicación a la semilla: La aplicación del inoculante a la semilla se realizó empleando turba como soporte o vehículo de los rizobios. La turba utilizada es la comercializada como soporte de inoculantes, consiste en turba molida y tamizada, la cual fue esterilizada mediante rayos gamma (proporcionada por los Dres. Dulce N. Rodríguez-Navarro y Francisco Temprano, IFAPA – Las Torres, Tomejil, Sevilla). Se utilizaron bolsas de turba estéril de 30 g, a las que se añadió el 50 % en volumen de caldo inoculante. Para el recubrimiento de la semilla se utilizó una relación de turba inoculada/adhesivo/semillas de 1/3/100 (p/v/p). Como adhesivo se empleó una solución estéril de sacarosa al 10 %.

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente en etanol al 70 % durante 1 min y posteriormente con hipoclorito sódico al 5 % durante 6 min, seguidamente se procedió a realizar lavados en agua destilada estéril. La esterilización se llevó a cabo en campana de flujo laminar.

### 3.1.1.3 Recopilación de datos en el ensayo de cámara

La supervivencia del inóculo en el suelo después de la retirada de las plantas del sustrato se analizó mediante dos metodologías distintas, a partir de suelo tomado del entorno de las raíces.



Figura 20. Prueba de recuento de microorganismos en placa Petri tratamiento F-B4 (izquierda), prueba del Número Más Probable (NMP) en cámara de cultivo (centro) y análisis de la supervivencia del rizobio mediante el recuento de nódulos en las raíces de las plantas de alubia (derecha).

La primera, mediante observación del crecimiento de microorganismos en placas de Petri sobre medio YMA, inoculando dichas placas con 4 suspensiones decimales de suelo ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). Y la segunda, mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) (Beck *et al.* 1993) utilizando para el experimento plantas trampa de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.), lo que permite analizar la supervivencia en el suelo de la cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* (Figura 20). Las plantas de alubia se sembraron de dos en dos en recipientes de 1 l de volumen. El suelo preparado en 4 suspensiones decimales por cada tratamiento ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) fue inoculado y cada suspensión se inoculó a 4 plantas de alubia.

Las plantas de trigo crecieron durante 35 días en la cámara de cultivo. Pasado este tiempo, se cortaron y analizaron para evaluar los parámetros altura máxima de la planta y biomasa aérea fresca.

### 3.1.1.4 Resumen de actividades del ensayo en cámara

La Figura 21 muestra las principales actividades llevadas a cabo en el ensayo realizado en cámara de cultivo, con objeto de analizar la supervivencia y el efecto sobre plantas de trigo de las bacterias aplicadas al abono y a las semillas.

Actividades del ensayo en Cámara de cultivo, 2010		Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4
Esterilización suelo		*			
Siembra trigo variedad <i>Rudo</i> , equivalente a 200 kg/ha		*			
Aplicación fertilizante 15-35-0 + Zn, equivalente a 50 Kg/ha					
Riegos cada 4 días (0,5 l / unidad)		* * * * *			
Muestreo destructivo final			*		
Secado muestras plantas 70°C 72 h y triturado				*	
-Recuento de microorganismos en laboratorio				*	
Muestras de suelo	-Siembra alubias			*	
	-Número Más Probable (NMP)			* * * *	
	-Conteo de nódulos				*
Análisis de datos				*	*

Figura 21. Cronograma del ensayo de supervivencia y efecto de los microorganismos en plantas de trigo, en suelo esterilizado.

### 3.1.2 Microcosmos en suelo real con plantas de trigo

Objetivo 3, Fase 2 de la investigación

El siguiente ensayo fue diseñado para evaluar el efecto de dos microorganismos (una cepa de rizobio B4 y otra de *Burkholderia*), utilizados individualmente y en combinación sobre plantas de trigo directamente o recubriendo el abono. El ensayo se ha realizado en invernadero en suelo sin esterilizar, analizándose por lo tanto el efecto de los microorganismos en competencia directa con los microorganismos nativos del suelo utilizando la metodología “caja negra”.

#### 3.1.2.1 Diseño experimental del ensayo en microcosmos sobre plantas de trigo

El diseño experimental fue completamente aleatorio con tres repeticiones, consistiendo cada unidad experimental en cinco macetas. En cada maceta (19 x 14 x 14), se sembraron cinco semillas de trigo a una distancia de 0,9 cm y a una profundidad de 1,5 cm de la superficie. El experimento se realizó en invernadero (Figura 22), entre el 25 de marzo y el 28 de junio de 2010.

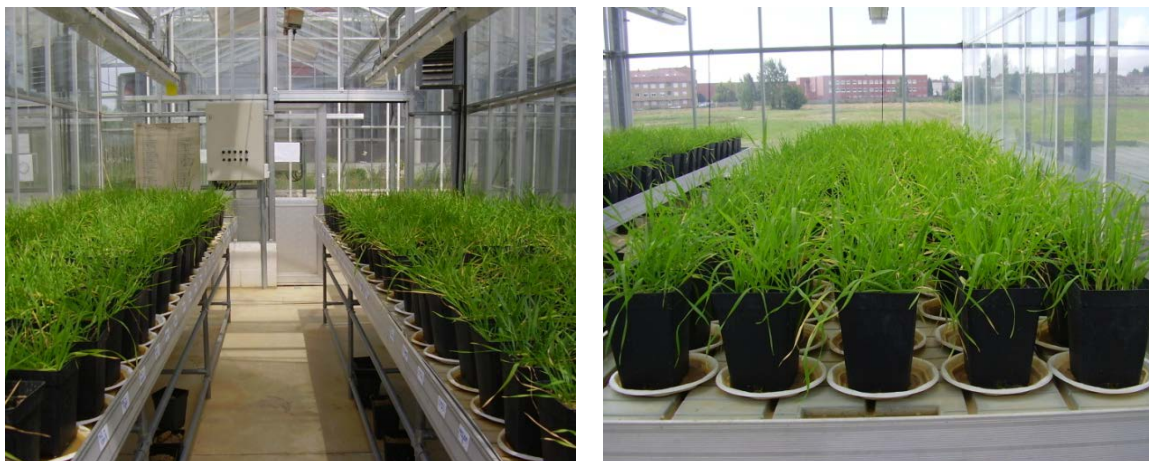


Figura 22. Plantas de trigo en el ensayo de microcosmos en invernadero.

El sustrato consistió en una mezcla de suelo de la finca de referencia de Villada (Palencia) (42° 14'19,97'' N, 4° 58'15,82'' O, altitud 795m) y vermiculita exfoliada de la granulometría N° 3 (Verlite, España) mezclada al 50 % v/v. El análisis físico químico del suelo, después de la mezcla con vermiculita, se presenta en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis del sustrato suelo/vermiculita utilizado en el ensayo de microcosmos.

Análisis de suelo		
Textura	Arena (%)	36
	Limo (%)	38
	Arcilla (%)	26
	Clase textural (USDA)	Franca
pH		9,36
Carbonatos (% caliza)		5,07
Materia orgánica (%)		1,74
N. Total (%)		0,11
Relación C/N		9,52
Fósforo Olsen (mg/kg)		11,98
Cationes (cmol/kg)	Calcio	20,51
	Potasio	0,42
	Magnesio	1,28
	Sodio	6,94
CIC (cmol/kg)		18,95
Oligoelementos (mg/kg)	Cobre	0,47
	Hierro	26,36
	Manganeso	7,72
	Zinc	0,38
Conductividad (dS/m)		0,18

Los riegos se realizaron cada 4 días con un volumen de 0,5 l de agua no clorada en cada maceta, con el objetivo de mantener un adecuado estado hídrico para la planta. Las plantas adventicias que aparecieron a lo largo del cultivo fueron retiradas manualmente tras los riegos periódicos.

### 3.1.2.2 Tratamientos evaluados en microcosmos sobre plantas de trigo

Los tratamientos fueron los mismos del ensayo de cámara excepto en que, a mayores, se ha incorporado otro fertilizante (Tabla 14). Por lo tanto, se han utilizado dos fertilizantes, el 15-35-



0 + Zn y el NAC 27 % <sup>(2)</sup>, y las mismas dos bacterias que en el ensayo anterior. En este caso, se ha evaluado el efecto de los microorganismos de tres maneras diferentes: primero se analizó el efecto de los microorganismos aplicados directamente en la semilla de trigo, con turba como soporte, cada microorganismo de manera individual y la mezcla; segundo, se ha evaluado el efecto de los microorganismos recubriendo el fertilizante 15-35-0 + Zn; tercero, el efecto de los microorganismos aplicados directamente sobre la semilla con la aplicación de los dos fertilizantes. La aplicación de los microorganismos sobre el abono se realizó de la misma manera que en el apartado 3.1.1.2. En este caso se han utilizado tres testigos o controles, el primero sin fertilizante, el segundo con el 15-35-0 + Zn y, por último, NAC 27 %.

**Tabla 14. Tratamientos realizados en el ensayo de microcosmos en invernadero.**

Descripción del tratamiento	Código
Control sin fertilizar	C
Control fertilizado con el Fertilizante 15-35-0+Zn.	CFI
Control fertilizado con el Fertilizante NAC 27 %.	CFII
Semilla recubierta con la cepa B4	S-R
Semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp	S-B
Semilla recubierta con la mezcla	S-RB
15-35-0+Zn recubierto con la cepa B4.	FI-R
15-35-0+Zn recubierto con la cepa <i>Burkholderia</i> sp.	FI-B
15-35-0+Zn recubierto con la mezcla de cepas.	FI-RB
15-35-0+Zn y semilla recubierta con la cepa B4	FI + SR
15-35-0+Zn y semilla recubierta con la cepa <i>Burkholderia</i> sp.	FI + SB
15-35-0+Zn y semilla recubierta con las 2 cepas	FI + SRB
NAC 27 % y semilla recubierta con la cepa B4	FII + SR
NAC 27 % y semilla recubierta con la cepa <i>Burkholderia</i> sp	FII + SB
NAC 27 % y semilla recubierta con la mezcla de las 2 cepas.	FII + SRB

La dosis equivalente de semilla de trigo variedad “Rudo” (descrita en el ensayo anterior), fue de 200 kg / ha. La dosis del fertilizante 15-35-0 + Zn y NAC 27 % fue 50 kg / ha, correspondiente a 0,9 g de abono por cada metro lineal. La dosis de fertilizante NAC 27 % aplicada fue la misma que para el 15-35-0 + Zn, lo cual supone un aporte 1,8 veces mayor de nitrógeno que con el abono complejo.

### 3.1.2.3 Recopilación de datos en el ensayo en microcosmos sobre plantas de trigo

En primer lugar se determinó el número de plantas de trigo que habían alcanzado cada uno de los estados fenológicos según Keller y Baggiolini (1954): A nascencia, D tres hojas, F pleno ahijado (Figura 23) e I un nudo,. Los controles de los estadios de las plantas se realizaron cada 3 días.

<sup>(2)</sup> Composición NAC Nitrato amónico cálcico 27%: Nitrógeno total 27 %, 13,5 % Nitrógeno amoniacal y 13,5 % Nítrico, 7-9,1 % CaO y 3-3,5 % MgO.



Figura 23. Primeros estados fenológicos analizados, plantas de trigo una vez completada la nascencia (izquierda), la formación de 3 hojas (centro) y pleno ahijado (derecha).

Setenta días después de la siembra en el estado de pleno ahijado, se muestreó una maceta por unidad experimental determinando la biomasa fresca, la biomasa seca y los contenidos de N, P, K, Ca, y Mg. El resto de las macetas fueron cosechadas a los 95 días y se estudió la biomasa fresca y seca. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con el programa SPSS v 19.0.

### 3.1.2.4 Resumen de actividades del experimento en microcosmos

La Figura 24 muestra las actividades correspondientes al ensayo descrito.

Actividades del ensayo en Microcosmos, 2010	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Mezcla suelo/vermiculita 3/1. Suelo Villada (Palencia)	*			
Siembra trigo variedad <i>Rudo</i> 5 plantas/maceta (200 kg/ha)	*			
Aplicación de los tratamientos, Semillas o abono recubiertos de microorganismos al 1% v/p	*			
Estado fenológico A: Nascencia	*****			
D: Tres hojas		*****		
F: Ahijado		*****		
I: Un nudo			*****	
Riegos cada 4 días, 0,5 l/maceta	*****	*****	*****	*****
Muestreo destructivo (70 días) corte de 1 maceta / tratamiento				*
Muestreo destructivo final (95 días) secado y triturado				*
Análisis de datos				
• Nº Plantas en los estados fenológicos	*****	*****	*****	*****
• Biomasa fresca y seca (Secado 72 h a 70 °C)				* *
• Contenido de N, P, K, Ca y Mg				* *

Figura 24. Cronograma del ensayo del efecto de los microorganismos sobre el desarrollo del trigo en condiciones de microcosmos.



### 3.2 Pruebas PGP *in vitro*

Objetivo 1, Fase 3 de la investigación

A continuación se detallan los microorganismos seleccionados para la evaluación, mediante pruebas en laboratorio, de las diferentes propiedades PGPR y la metodología llevada a cabo.

#### 3.2.1 Microorganismos utilizados en el estudio

La colección de microorganismos utilizada está compuesta por 47 accesiones de *Rhizobium* autóctonos de Castilla y León (Tabla 15).

**Tabla 15. Colección de cepas de rizobios utilizadas en la investigación (Mulas 2010).**

Aislamiento	Cepa
Castilla y León	A1
	A2
	A3
	A4
	A5
	A6
	A7
	A8
	A9
	A10
	A11
	A12
	A13
	B1
	B2
	B3
	B4
	B5
	C1
	C2
	C3
	C4
	C5
	C6
	C7
	C8
	C9
	C10
	C11
	C12
	C13
	C14
	C15
	C16
	D1
	D2
	D3
	D4
	D5
	D6
	D7
	D8
	D9
	D10
	E1
	E2
	E3

Dichos rizobios fueron aislados a partir de nódulos radiculares de alubia (*Phaseolus vulgaris*. L) de la variedad "Riñón" de la IGP "Alubia de la Bañeza-León". Las cepas de *Rhizobium* seleccionadas pertenecen a la especie *Rhizobium leguminosarum* salvo dos, C5 y C1, que han sido identificadas como *Rhizobium giardinii* (Mulas 2010, García Fraile 2010, Mulas *et al.* 2011).

La colección activa de cepas se mantuvo en placas Petri de YMA (Vincent, 1970) (Tabla 12, izquierda) a una temperatura constante de 4 °C, resemebrándolas cada tres meses.

El mantenimiento a largo plazo de las cepas se realizó a temperatura de -80 °C, utilizando como agente crioprotector glicerol en solución acuosa al 30 %, que se repartió en criotubos (1 ml) esterilizados durante 20 min a 120 °C en autoclave. Para la preparación de los criotubos se partió de cultivos crecidos en medio YMA durante 5 días a 28 °C, se prepararon suspensiones celulares de cada una de los aislados en la solución crioprotectora. Cada una de las cepas se preservó por cuadruplicado.

### 3.2.2 Prueba de solubilización de fósforo

La detección de la capacidad de solubilización de fosfato mineral insoluble se realizó en placas Petri con medio YED-P (extracto de levadura 0,5 %, glucosa 1 % y agar 2 %), con 4 g/l de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  insoluble (Tabla 16), lo cual provocó una turbidez blanquecina característica del medio. En este medio los aislados fueron incubados durante 7 días a 28 °C. La capacidad de las bacterias para la solubilización de fosfato se observó por la presencia de halos de solubilización en torno a las colonias, lo cual nos indicó que son capaces de solubilizar el  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Peix *et al.* 2003).

Tabla 16. Composición del medio YED-P.

Compuesto	Cantidad
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	10 g
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	4 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

### 3.2.3 Producción de ácido indolacético (IAA)

Para analizar la capacidad de producción de IAA, se cultivaron las bacterias en el medio JMM (O'Hara, 1989), con triptófano a una concentración final de 0,167 g/l (Tabla 17). El ácido indolacético (IAA) es un derivado químico del aminoácido triptófano (Figura 25).

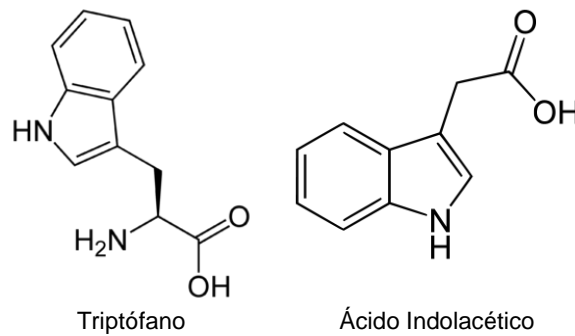


Figura 25. Estructura del triptófano y del ácido inolacético.

Tabla 17. Composición del medio JMM modificado y composición de la solución de vitaminas.

Compuestos Medio JMM	Cantidad	Solución de vitaminas	
D-(+)-Galactosa	1,8 g	Riboflavina	20,0 mg
L-(+)-Arabinosa	1,5 g	Ácido P-amino benzoico	20,0 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	26,1 mg	Ácido nicotínico	20,0 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,5 mg	Biotina	20,0 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147 mg	Tiamina-HCl	20,0 mg
H <sub>2</sub> O ajustar a	979 ml	Piridoxina-HCl	20,0 mg
Solución de triptófano	20 ml	Pantotenato cálcico	20,0 mg
Solución de vitaminas	1 ml	Inositol	120,0 mg
		Agua destilada	100,0 ml

Las soluciones de triptófano y de vitaminas se incorporaron al medio JMM una vez esterilizado a una temperatura inferior a 30 °C. La solución stock de triptófano (50 x) se preparó con 1,67 g de L-Triptófano en 200 ml de agua y se esterilizó por filtración (0,2 µm). En la preparación de la solución de vitaminas, todos los ingredientes se disolvieron en la solución tampón 0,05 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0) y dicha solución se esterilizó también por filtración (0,2 µm).

Para la preparación del inóculo las bacterias se cultivaron en medio YMA y se resuspendió masa bacteriana en solución salina (0,8 % NaCl) estéril hasta llegar a una concentración de 6 x 10<sup>8</sup> UFC / ml (2,0 en el patrón de Mc. Farland). Se añadieron 500 µl de esta suspensión a 4 ml de medio JMM en viales de vidrio. Éstos viales se incubaron a 28 °C durante 3 días en oscuridad y en agitación a 200 r.p.m. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro Beckman Du®640, para tener una orientación del crecimiento microbiano en el medio con triptófano.

A continuación, de los viales se tomaron 1,5 ml y se centrifugaron a 5.000 r.p.m durante 10 min para eliminar las células. Se recogió 1 ml de cada muestra y se le añadió 1 ml de agente Salkowsky (FeCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Gordon y Weber 1951). La mezcla se dejó reaccionar durante 30 min en oscuridad para revelar la coloración. El agente Salkowski se preparó tomando 1 ml de cloruro

férrico 0,5 mol/l y 50 ml de ácido perclórico al 35 %, se agitó bien y se llevó a un baño María a 60 °C durante 5 min.

La cantidad de IAA sintetizada por las bacterias está directamente relacionada con la intensidad del color rosáceo, lo que se determinó midiendo la absorbancia 535 nm (Figura 26). Cada muestra se analizó por triplicado. Para obtener los datos de  $\mu\text{g}$  de IAA/ml se elaboró una curva patrón con concentraciones estándar de IAA.



Figura 26. Se observa el cambio de coloración del medio JMM modificado con el agente Salkowski; la intensidad del color rosáceo es indicador de la cantidad de IAA producido. Las muestras corresponden de izquierda a derecha con C3, B4, D2 y A13.

### 3.2.4 Producción de sideróforos

Los microorganismos del estudio fueron evaluados por su capacidad de producir sideróforos desde el punto de vista cualitativo, utilizando *Chrome Azurol S (CAS)* agar de Schwyn y Neilands (1987) (Figura 27). La preparación del medio M9-CAS-agar modificado consiste en la adición de un disolvente catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio HDTMA, que estabiliza el complejo Fe-CAS indicador con un color azul característico (Alexander y Zuberer, 1991). Los complejos CAS / HDTMA se unen fuertemente con el hierro férrico para producir un color azul. Cuando un quelante del hierro fuerte como un sideróforo elimina el hierro del complejo colorante Fe-CAS, el color cambia de azul a naranja.

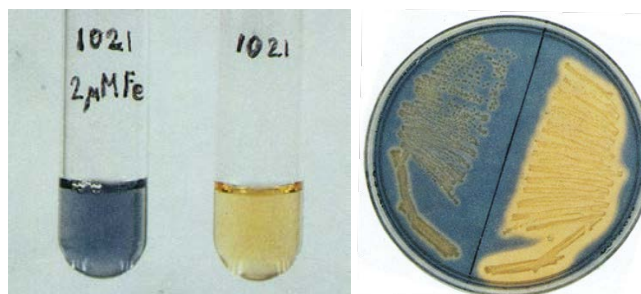


Figura 27. Prueba de sideróforos (Schwyn y Neilands 1987).

Este medio M9-CAS-agar modificado fue preparado partiendo de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de manera individual y finalmente mezcladas para obtener el medio de cultivo con un color azul-verdoso característico.

La solución 1, se preparó mezclando 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM (disueltos en HCl 10 mM), con una solución acuosa de 50 ml de CAS (1,21 mg / ml) obteniendo una solución acuosa de intenso color púrpura, posteriormente se mezcló con 40 ml de una solución acuosa de HDTMA (1,82 mg / ml). La solución resultante presentó un color azul marino denso y se autoclavó a 120 °C durante 20 minutos.

Para la elaboración de la solución 2 (solución tampón) en primer lugar se preparó una solución salina (Tabla 18) con PIPES (piperazina-N, N'-bis[ácido 2-ethanesulfónico) ajustando el pH a 6,8. Esta solución también se autoclavó.

**Tabla 18. Solución 2 del M9-CAS-Agar.**

Compuesto	Cantidad
PIPES	30,24 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,3 g
NaCl	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0 g
Agar	15 g
Agua destilada	750 ml

La solución 3 se preparó adicionando en 70 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada los compuestos detallados en la Tabla 19 y también se autoclavó.

**Tabla 19. Solución 3 del M9-CAS-Agar.**

Solución 3	Cantidad
Sacarosa	2 g
Manitol	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	493 mg
$\text{CaCl}_2$	11 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,17 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,4 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg
$\text{H}_2\text{O}$	70 ml

La solución 4 fue una disolución de 30 ml de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de la caseína) al 10 % p/v esterilizada mediante filtración por una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore, Amicon, EEUU).

Las soluciones esterilizadas por el procedimiento que se indica en cada caso, se mezclaron en campana de flujo laminar cuando la temperatura bajó a 50 °C; la solución 4 se incorporó a la mezcla final en último lugar.

En las placas Petri preparadas con este medio se sembraron las cepas y se incubaron durante un mínimo de 5 días a 28 °C. Las placas se observaron a distintos tiempos para ver la evolución en la producción de sideróforos, que se manifestó con la formación de halos rojizos-anaranjados

(Figura 26) rodeando las colonias formadas. El color cambia a anaranjado debido a que el hierro se une a los sideróforos bacterianos y se retira del complejo colorante.

### 3.2.5 Actividad ACC desaminasa

Para la determinación de la actividad del complejo enzimático se utilizó el medio *DF Salts Minimal Medium* (Dworkin y Foster. 1958) (Tabla 20).

Tabla 20. Descripción del Medio Mínimo DF Sales.

Medio Mínimo DF Sales			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g	<b>Solución de Elementos traza</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10,0 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	11,19 mg
Glucosa	2,0 g	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	124,6 mg
Acido Glucónico	2,0 g	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	78,22 mg
Acido Cítrico	2,0 g	MoO <sub>3</sub>	10,0 mg
Elementos traza	0,1 ml	Agua destilada estéril	100,0ml
*FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O Solución	0,1 ml	<b>* Solución FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O:</b>	
Agua destilada	1000 ml	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100,0mg
		Agua destilada y esterilizada	10,0ml

A partir de este medio base se preparó otro con ACC (ácido 1-aminociclopropano- 1-carboxílico) como única fuente de N. Por lo tanto, se prepararon dos soluciones diferentes, la primera se utilizó para el control negativo y la segunda fue suplementada con ACC (Figura 28, izquierda). Cada bacteria se inoculó por triplicado en cada uno de los dos medios descritos en viales de 5 ml de medio, de manera que para cada bacteria se utilizaron 6 viales. Las bacterias que crecen en el medio mínimo suplementado con ACC 0,5 M (30 µl por tubo), y no en el medio sin nitrógeno, son capaces de utilizar el ACC como fuente de N y por lo tanto tienen activo el complejo enzimático de la ACC desaminasa. Si crecen en el medio sin ninguna fuente de N serían capaces de fijar N atmosférico en vida libre (Gaye. 2006).

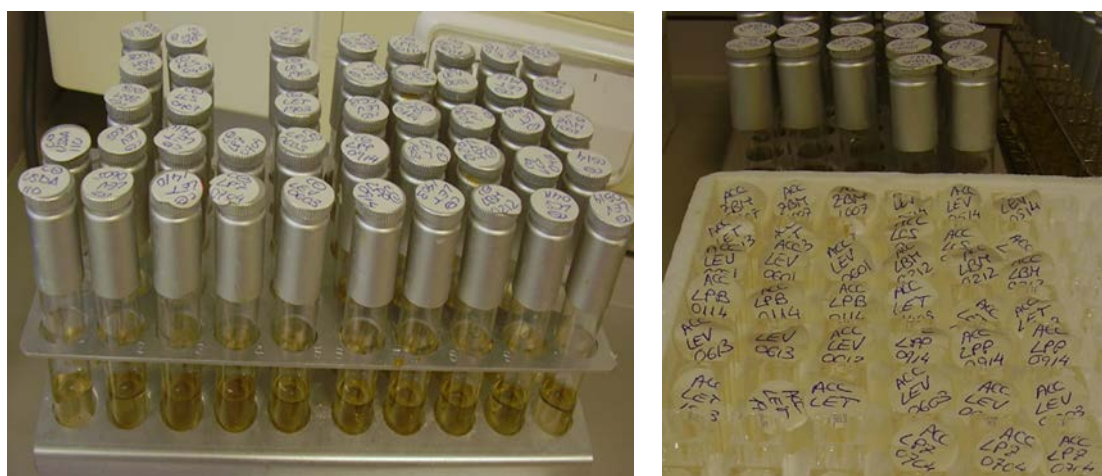


Figura 28. Imágenes de la prueba del ACC, tubos con medio mínimo DF sales (izquierda) y cubetas para medir densidad óptica de las bacterias crecidas en presencia de ACC (derecha).

La Solución Stock ACC 0,5 M se esterilizó mediante filtración por membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  y se almacenó a -20  $^{\circ}\text{C}$ .

Los tubos con el medio de cultivo se inocularon con 30  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC / ml. Después de aplicar el inóculo se agitaron los tubos en el vórtex para distribuir las bacterias en el medio de manera homogénea.

Los tubos inoculados se incubaron a 28  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 días y se agitaron dos veces al día, a primera y última hora en el vórtex. Pasado este tiempo se midió la OD (Densidad Óptica) a 600 nm de los 6 tubos de cada bacteria (Figura 28, derecha).

### 3.3 Microcosmos en plantas de cebada

Objetivo 4, Fase 4 de la investigación
--

El objetivo de este ensayo fue seleccionar, entre las bacterias con mayor actividad PGP *in vitro*, las de mejor efecto PGP *in vivo* sobre plantas de cebada, optimizando al mismo tiempo la dosis de bacterias, aplicando el microorganismo de manera individual o en combinaciones binarias de manera directa (sin abono) y trabajando en suelo no estéril (microcosmos).

Al utilizar suelo íntegro, la elección de la dosis de bacterias es realista, porque se tiene en cuenta la competencia de otros microorganismos del suelo. Las plantas cerraron el ciclo y se pudo analizar el rendimiento y sus componentes.

#### 3.3.1 Diseño experimental

El cultivo se realizó en las mismas condiciones que en el ensayo descrito en el apartado 3.1.2.1, estableciéndose un diseño factorial con dos factores cepa y dosis, en unidades experimentales completamente al azar con tres repeticiones. Cada unidad experimental consistió en cinco macetas (Figura 29) con 5 semillas separadas 0,9 cm en cada maceta.

La variedad empleada fue Quinta, una cebada de dos carreras (*Hordeum vulgare* var. *distichon* L.) de primavera de ciclo corto, encañado precoz y con una capacidad de ahijamiento media-alta. El sustrato empleado fue una mezcla 1:1 en volumen de suelo y vermiculita. El suelo empleado procede de una finca de secano dedicada a la rotación cereal – cereal – leguminosa ubicada en el término municipal de Frómista (Palencia) (42 $^{\circ}$  16' 49,48'' N, 4 $^{\circ}$  24' 15,08'' O, altitud 788 m). La composición del suelo se presenta en la Tabla 21.

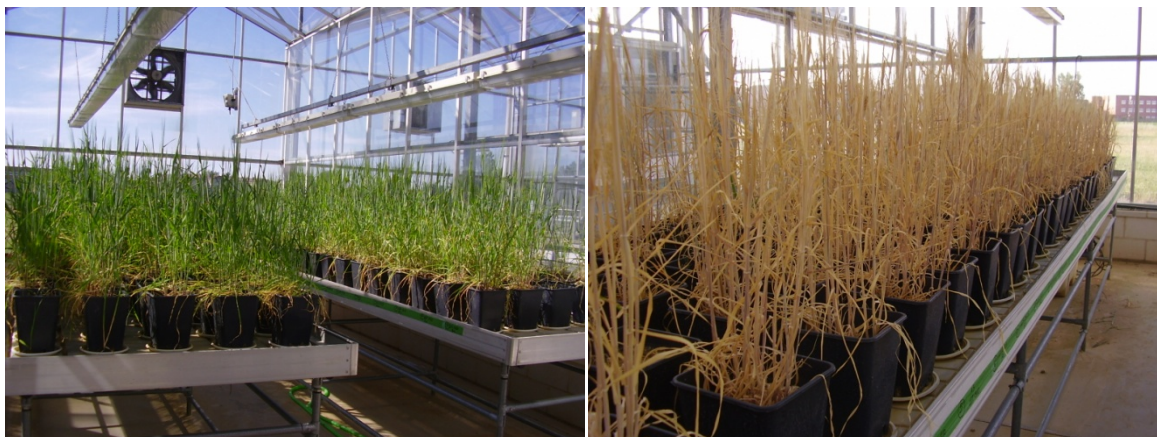


Figura 29. Ensayo de microcosmos para la evaluación de la inoculación de microorganismos sobre plantas de cebada.

Tabla 21. Análisis del suelo utilizado para los ensayos de microcosmos.

Análisis de suelo		
Textura	Arena (%)	40
	Limo (%)	26
	Arcilla (%)	34
	Clase textural (USDA)	D (franco-arcillosa)
pH		8,69
Carbonatos (% caliza)		6,97
Materia orgánica (%)		1,54
N. Total (%)		0,13
Relación C/N		6,87
Fósforo Olsen (mg/kg)		20,5
Cationes (cmol/kg)	Calcio	27,07
	Potasio	0,66
	Magnesio	2,93
	Sodio	6,41
CIC (cmol/kg)		10,27
Ologoelementos (mg/kg)	Cobre	0,22
	Hierro	12,40
	Manganeso	3,42
	Zinc	0,29
Conductividad (dS/m)		0,28

La siembra se realizó el 17 de febrero de 2011. Durante el cultivo se realizó el siguiente programa de fertilización:

- 14 / Abril / 2011: 25 ml por maceta de 15-35-0 + Zn a una concentración de 8 g / l.
- 25 / Abril / 2011: 25 ml por maceta de NAC (27%) a una concentración de 8,4 g / l.

Se realizó un tratamiento contra pulgones el 12 de Mayo de 2011 con Pirimicarb (50% p/p) a la dosis recomendada por el fabricante.

El 2 de mayo, antes de empezar el espigado, se recogió una maceta de cada tratamiento y bloque, para determinar número de plantas por maceta (sobre 5 semillas sembradas), el peso fresco y el peso seco de la biomasa aérea. La biomasa aérea fue molturada con un molino de martillos, y el material vegetal fue analizado para determinar el contenido de N (%) por el



método Kjeldahl y P, K, Ca, Mg (mg / g), mediante digestión (en 10 mL de ácido nítrico al 65% a 200 °C durante 20 minutos) y espectroscopía de emisión atómica ICP-AES. Estos datos permitieron calcular la cantidad total de estos elementos acumulada en la biomasa aérea.

El 23 de junio se inició la cosecha de las plantas, contando el número de espigas por unidad experimental, que tras el muestreo intermedio estaba constituido por 4 macetas. Se determinó la biomasa total y, posteriormente, se procedió a la trilla determinando el rendimiento por unidad experimental. Para referir los datos de rendimiento a peso seco, se secó el grano a 70 °C durante 72 horas.

### 3.3.2 Tratamientos evaluados

Antes de la inoculación se hizo una prueba de compatibilidad a los microorganismos que se iban a utilizar. No existió incompatibilidad entre cepas y, por lo tanto, la selección se basó en criterios relacionados con los resultados obtenidos en las pruebas de promoción del crecimiento vegetal (Tabla 22).

**Tabla 22. Cepas seleccionadas en el ensayo y descripción de las razones de selección.**

Cepa	Razones para la selección de las cepas
• C4	La cepa más productora de IAA, que además produce sideróforos.
• D7	Cepa con alta producción de IAA, con origen geográfico diferente.
• A7	Mayor actividad ACC desaminasa.
• B4	La cepa solubilizadora de fosfatos.
• Cóctel 1	<b>C4</b> y la cepa solubilizadora de fosfato <b>B4</b> .
• Cóctel 2	<b>C4</b> y la cepa de mayor actividad ACC desaminasa <b>A7</b> .

Para el establecimiento de los tratamientos en este ensayo se partió de dos variables, la cepa y la dosis de microorganismos aplicada Tabla 23.

Primera variable: La cepa o combinación de cepas utilizadas. Tratamientos inoculados con la cepa B4, con otras 3 nuevas cepas y con 2 combinaciones binarias de cepas, en este último caso con propiedades PGP *in vitro* complementarias (5 tratamientos). Además se incorporó un testigo sin microorganismos.

Segunda variable: La dosis del microorganismo, que fueron las siguientes:  $5 \times 10^5$ ;  $5 \times 10^6$ ;  $1,3 \times 10^4$ ;  $5 \times 10^7$  UFC / ml de caldo inoculante, que es el volumen de inoculante distribuido en cada maceta o aproximadamente  $10^3$ ,  $10^4$ , 26 y  $10^5$  UFC / g de suelo . Para preparar estas diluciones se partió de suspensiones bacterianas de una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC / ml. La justificación de las dosis de bacterias se presenta en la Tabla 23.

**Tabla 23. Justificación de la dosis de bacterias utilizada en el ensayo de microcosmos para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones.**

Dosis de la bacteria (UFC) en cada maceta en el ensayo	Concentración de bacterias que se colocaría inicialmente en suelo si el microorganismo se aplicara recubriendo el abono en una relación 0,5% volumen de caldo inoculante/masa de abono*	Razón por la que se prueba esta dosis	Concentración de microorganismos en el caldo inoculante con el que se recubrirá el abono para alcanzar la concentración propuesta
$5 \cdot 10^5$	$9,3 \cdot 10^2$ UFC / g Aprox. $10^3$ UFC / g de suelo	Sería la concentración de bacterias que inicialmente se depositarían en suelo, con el fertilizante recubierto sin procesar el caldo	Aprox. $10^9$ UFC / ml
$5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$ UFC / g de suelo	Es la concentración recomendada para asegurar la acción de nodulación de los rizobios en las leguminosas	Aprox. $10^{10}$ UFC / ml
$1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26 UFC / g de suelo	Sería la concentración de bacterias <b>final</b> en suelo, tras fertilizar con el fertilizante recubierto sin procesar el caldo, suponiendo una supervivencia de 1 de cada 35 bacterias ( $9,3 \cdot 10^2 / 35$ )	Aprox. $10^9$ UFC / ml
$5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$ UFC g / de suelo	Concentración más elevada y la máxima que por razones técnicas podría alcanzarse en el caldo inoculante con el que se recubrirá el abono	Aprox. $10^{11}$ UFC / ml

\* Calculado para condiciones de siembra directa, es decir 50 kg de abono recubierto / ha, considerando una profundidad de 2 cm de suelo y una densidad aparente del suelo de  $1,35 \text{ t/m}^3$ , lo que supone una masa de 270 t de suelo por ha.

La preparación de las diferentes concentraciones de los microorganismos seleccionados consistió en un análisis individual de cada bacteria mediante recuento de microorganismos en placa y su relativa absorbancia (OD 600 nm) en el caldo de cultivo YMB, estableciendo de esta manera las diferentes curvas de crecimiento. Una vez establecidas las concentraciones de microorganismos de partida seleccionadas para el ensayo, se procedió al ajuste de la concentración mediante dilución en solución salina 0,9 % o en los casos que así lo requirieran, aumentando la concentración mediante la suspensión de masa bacteriana hasta llegar a la concentración deseada.

La inoculación de las semillas se llevó a cabo el mismo día que la siembra de la cebada. En la superficie de la maceta se humedeció una línea central donde se colocaron las semillas. En la inoculación se aplicó 1 ml de caldo de cultivo a las distintas concentraciones (Tabla 24) por maceta, distribuyendo el contenido de manera homogénea sobre las 5 semillas (Figura 30).

Tabla 24. Tratamientos del ensayo de microcosmos.

Código	Tratamiento	Dosis UFC / maceta	Dosis UFC / g de suelo
A1	C4	Aprox. $5 \cdot 10^5$	Aprox. $10^3$
A2	C4	Aprox $5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$
A3	C4	Aprox. $1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26
A4	C4	Aprox. $5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$
B1	D7	Aprox. $5 \cdot 10^5$	Aprox. $10^3$
B2	D7	Aprox $5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$
B3	D7	Aprox. $1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26
B4	D7	Aprox. $5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$
C1	A7	Aprox. $5 \cdot 10^5$	Aprox. $10^3$
C2	A7	Aprox $5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$
C3	A7	Aprox. $1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26
C4	A7	Aprox. $5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$
D1	C4 + A7	Aprox. $5 \cdot 10^5$	Aprox. $10^3$
D2	C4 + A7	Aprox $5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$
D3	C4 + A7	Aprox. $1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26
D4	C4 + A7	Aprox. $5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$
E1	C4 + B4	Aprox. $5 \cdot 10^5$	Aprox. $10^3$
E2	C4 + B4	Aprox $5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$
E3	C4 + B4	Aprox. $1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26
E4	C4 + B4	Aprox. $5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$
F1	B4	Aprox. $5 \cdot 10^5$	Aprox. $10^3$
F2	B4	Aprox $5 \cdot 10^6$	Aprox. $10^4$
F3	B4	Aprox. $1,3 \cdot 10^4$	Aprox. 26
F4	B4	Aprox. $5 \cdot 10^7$	Aprox. $10^5$
T	Control sin inocular		



Figura 30. Inoculación de los microorganismos sobre las semillas de cebada.

### 3.3.3 Resumen de actividades del experimento en microcosmos

La Figura 30 muestra las principales actividades llevadas a cabo en el ensayo realizado en invernadero, con objeto de evaluar las bacterias con mayor efecto PGP y las dosis más adecuadas, sobre plantas de cebada y en ausencia de abono.

Actividades del ensayo en Microcosmos, 2011	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Mezcla suelo/vermiculita 3/1. Suelo Frómista (Palencia)	*				
Siembra cebada variedad <i>Quinta</i> , 5 plantas/maceta (200 kg / ha)	*				
Inoculación directa sobre la semilla de 4 cepas de rizobios y 2 combinaciones a diferentes concentraciones	*				
Abonado 25 ml de 15-35-0 + Zn (8 g / l) por maceta			*		
Abonado 25 ml de NAC 27 % (8,4 g / l) por maceta			*		
Riegos cada 4 días, 0,5 l / maceta	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Tratamiento de pulgones Pirimicarb				*	
Supresión del riego					*
Recolección, secado (72h a 70°C) y triturado de las plantas.					*
Análisis de datos					*

Figura 31. Cronograma del ensayo de evaluación de las bacterias con mayor actividad PGP in vivo sobre plantas de cebada, optimizando la dosis de bacterias en microcosmos.

### 3.4 Nivel de interacción entre rizobios y raíces

Objetivo 5, Fase 5 de la investigación

En este ensayo se analizó el grado de interacción entre la bacteria y la raíz de la planta de cebada, en condiciones de esterilidad mediante la transformación de la cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* con la sonda GFP (Green Fluorescent Protein), para visualizar el nivel de colonización de la raíz en tiempo real.

#### 3.4.1 Material microbiano

Para ello se transformó la cepa de *Rhizobium* B4 seleccionada en base a sus propiedades PGPR, con la cepa *E. coli* S17.1 (Simon *et al.* 1983), utilizada para la transferencia del plásmido pHC60 (Figura 32), vector estable en la rizosfera. El plásmido contiene como marcador un gen de resistencia a la tetraciclina (Cheng y Walker. 1998).



ingredientes con EDTA 1 g / l en agua destilada a pH 5,0. La esterilización se llevó a cabo mediante filtración (Whatman 2 µm).

**Tabla 26. Composición del medio mínimo para *Rhizobium* (O'Hara y Shanmugam, 1976) modificado.**

Medio Mínimo	g/l	Solución de Vitaminas	mg/l	Elementos Traza	mg/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	Riboflavina	20,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	145,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3	Ácido P-amino benzoico	20,0	FeSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	125,0
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,15	Ácido nicotínico	20,0	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	59,0
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05	Biotina	20,0	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	5,0
NaCl	0,1	Tiamina-HCl	20,0	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	4,3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,1	Piridoxina-HCl	20,0	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	108,0
Manitol	10,0	Pantotenato cálcico	20,0	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	125,0
<b>Solución Vitaminas</b>	1ml/l	Inositol	120,0		
<b>Solución Elementos Traza</b>	1ml/l				

Para comprobar que las colonias elegidas en Medio Mínimo fueran colonias puras de rizobios transconjugantes, se sembró un duplicado de cada bacteria en medio Violet Red Agar VRA (Davis. 1951), medio en el cual puede crecer *E.coli* pero no los rizobios, ya que contiene lactosa como fuente de carbono (Tabla 27). Todos los medios, a excepción del primer YMA, estuvieron suplementados con tetraciclina a una concentración de 10 µg / ml, para que se mantuviera el plásmido pHC60 en cuya construcción participa junto con la GFP el gen de resistencia a la tetraciclina (Cheng y Walter, 1998).

**Tabla 27. Composición medio Violet Red Agar, VRA (Davis 1951).**

Compuesto	Cantidad g/l
Extracto de levadura	3,0
Peptona	7,0
Sales Biliares	1,5
Lactosa	10,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002

### 3.4.3 Transferencia de ADN del plásmido mediante conjugación biparental.

Para llevar a cabo la conjugación se tomaron cultivos de *Rhizobium* y de la cepa S17.1 de *E. Coli*, se sembraron conjuntamente en placas de TY con tetraciclina y se dejaron incubar 24 h a 28 °C. Este periodo se considera suficiente para que *E. coli* transfiera el plásmido pHC60 al rizobio seleccionado. Dicho plásmido contiene los genes necesarios para su transferencia por conjugación (primer paso, Figura 32).

### 3.4.4 Aislamiento del *Rhizobium* transformado.

Concluidas las 24 h de incubación en medio TY con tetraciclina (Figura 33, A), se realizó una siembra en Medio Mínimo para *Rhizobium* con tetraciclina (O'Hara y Shanmugam, 1976 modificado) con el fin de obtener colonias aisladas, por el método denominado de agotamiento.



Figura 33. Pasos en el marcaje de *Rhizobium* sp. con GFP. La imagen A muestra el proceso de trasconjugación, B y C muestran el crecimiento de los transconjugantes para separarlos de *E. coli*.

Cada colonia aislada fue transferida a dos placas diferentes, respectivamente con los siguientes medios de cultivo: medio VRA (*Violet Red Agar*, Schalab) incubado a 37 °C (Figura 33, B) y Medio Mínimo para *Rhizobium* incubado a 28 °C (Figura 33, C). Ambos medios fueron suplementados con tetraciclina. Dado que *Rhizobium* no crece en medio VRA y sí lo hace en el Medio Mínimo, se consideró que un aislado con crecimiento positivo en Medio Mínimo y negativo en VRA constituía una colonia pura de transconjugante de *Rhizobium*, habiéndose eliminado completamente *E. coli*.

### 3.4.5 Inoculación de raíces de cebada y observación al microscopio.

Con la cepa de rizobios transformada, se realizaron tres pruebas de inoculación de semillas de cebada variedad Quinta descrita en el apartado 3.3.1, para analizar la interacción entre la bacteria y la rizosfera, en condiciones de esterilidad. Las semillas de cebada fueron esterilizadas superficialmente (etanol 70 % durante 1 min e hipoclorito sódico al 5 % durante 7 min), y se germinaron en placas Petri de 90 mm Ø en medio agar-agua (1 %) en condiciones de esterilidad y mantuvieron en estas placas durante un tiempo variable según las diferentes pruebas.

Primera prueba.

Las semillas germinadas fueron transferidas a las 48 h de la siembra, a placas estériles de vidrio de 140 mm Ø, con filtros Whatman 150 mm Ø empapados en medio YMB, e inmediatamente las raíces de cada plántula se inocularon con 250 µL con una suspensión del cultivo puro en YMB de la bacteria a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC /ml (Figura 34. A). Las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 10 días desde el momento de la inoculación, al cabo de los cuales se

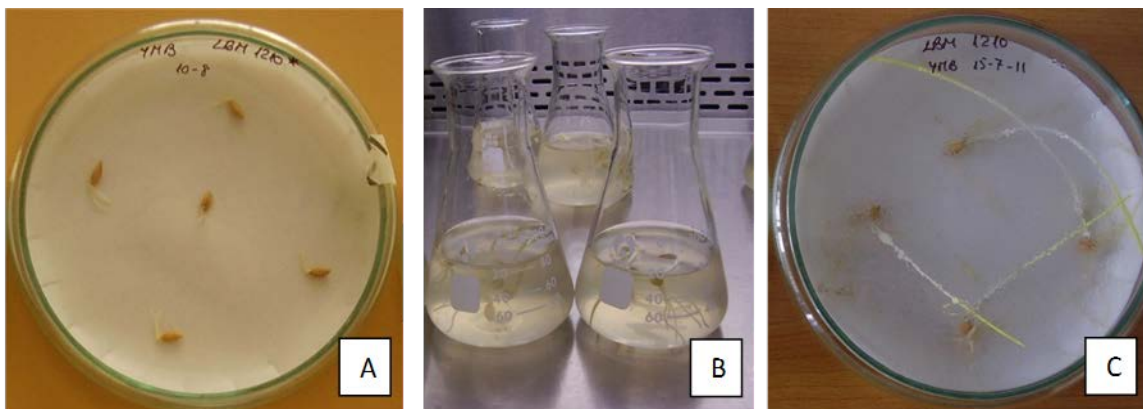
realizó una observación de la raíz con microscopía confocal para visualizar los rizobios marcados con la sonda GFP al microscopio confocal.

Segunda prueba.

En este caso, el período desde la siembra hasta el trasplante se aumentó de 48 a 96 h para realizar el estudio sobre plántulas algo más desarrolladas. La metodología para la inoculación también se modificó. Las plántulas listas para el trasplante fueron sumergidas durante 30 min en un cultivo puro del rizobio transformado a la misma concentración que en la prueba anterior. A los 10 días se realizó la observación (Figura 34. B).

Tercera prueba.

Se realizaron algunas modificaciones. Las plántulas listas para el trasplante se sumergieron durante 3 horas en una suspensión  $1 \times 10^8$  UFC / ml en solución salina al 0,8 %, de la bacteria B4 transformada. El trasplante se realizó también en placas Petri de 140 mm Ø, pero en este caso se les añadió una base de agar-agua (1 %) para mantener la humedad durante todo el período de crecimiento de la plántula. Sobre este fondo se colocó el filtro Whatman, empapado con la misma suspensión de la bacteria B4 en la que se habían sumergido las plántulas. Las placas se mantuvieron húmedas durante el experimento con YMB estéril, para favorecer el crecimiento de las bacterias (Figura 34. C). La incubación se realizó en las mismas condiciones ya indicadas. La observación microscópica se efectuó a los 10 días desde la inoculación.



**Figura 34.** Semillas de cebada pregerminadas inoculadas con la cepa B4 de Rhizobium y trasferidas a las placas Petri (A), semillas sumergidas en caldo de cultivo en la segunda prueba (B) y plántulas con 10 días en la tercera prueba (C).

El microscopio utilizado para la observación de la colonización de las raíces por las bacterias ha sido Microscopio Axioskop 2 Mot (Zeiss) y las fotos obtenidas en dicho estudio con cámara SPOT RT Monocroma (Diagnostic Instruments Inc.).



### **3.4.6 Aislamiento de posibles endófitos del interior de la raíz, extracción de ADN y comparación de su perfil RAPD con la bacteria inoculada.**

En la segunda y tercera prueba, a los 10 días de ensayo se realizó un cultivo en medio YMA del contenido interno de raíces, una vez esterilizadas superficialmente. El objetivo fue averiguar si algún rizobio había penetrado en el interior de la raíz.

En la segunda prueba, el exterior de la raíz se esterilizó en etanol al 70 % durante 1 min seguido de 5 min en NaClO al 7 % y 6 lavados en agua estéril. Las raíces esterilizadas se machacaron y la pasta resultante se extendió sobre medio YMA. Se realizaron diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ ) con solución salina estéril al 0,8 %. Además se incluyó un testigo de raíz esterilizada y sin machacar con el fin de comprobar que la esterilización exterior había sido efectiva y que no crecía ningún microorganismo.

En la tercera prueba, la esterilización de la raíz se realizó en condiciones menos agresivas, utilizando NaClO al 5 % en vez de NaClO al 7 %, durante el mismo periodo de tiempo, 5 min.

#### **3.4.6.1 Extracción y purificación del ADN**

La extracción del ADN se llevó a cabo partiendo de las cepas sembradas en placas TY y previamente incubadas durante 24-48 h a 28 °C. Se resuspendieron las células en 200 µl de agua estéril. Se centrifugó durante 15 seg a 10.000 r.p.m. Las células se resuspendieron en 200 µL de sarcosyl al 1 %, se centrifugó a 14.000 r.p.m durante 4 min y se desechó el sobrenadante. La extracción del ADN se llevó a cabo añadiendo a las células 100 µl de NaOH 0,05 M, que se calentaron a 100 °C durante 4 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 300 µl de agua miliQ estéril, se homogeneizó la mezcla de forma suave y se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 3 min para eliminar los restos celulares.

Para la purificación del ADN separándolo de los restos de proteínas, después de la centrifugación se trasvasó el sobrenadante a un segundo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1); posteriormente se homogeneizó con micropipeta durante 10 seg y se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 3 min. La fase acuosa se trasvasó a un tubo nuevo y se adicionó un volumen equivalente de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó nuevamente durante 10 seg y se centrifugó durante 3 min a 12.000 r.p.m. Se trasvasó una vez más la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadieron 7 µl de acetato de sodio pH 7 y 400 µl de etanol absoluto (Merck). Se homogeneizó la muestra con la pipeta y se mantuvo a -20 °C durante 12 h. Las muestras se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y las muestras se secaron en estufa a 37 °C durante 2 h. Se agregaron 200 µL de agua miliQ estéril a cada uno de los tubos y se calentaron a 42° C durante 15 min para rehidratar y resuspender el ADN.

### 3.4.6.2 Amplificación del ADN para obtener perfiles de RAPD

A partir de los perfiles de bandas se efectuó la comparación de los aislados. El análisis de perfiles RAPD (Radom Amplified Polymorfic DNA) es una de las técnicas más útiles porque permite estudiar genomas complejos siendo una técnica simple y de relativamente bajo coste. Se trata de un método basado en la amplificación al azar mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de diversas secuencias de ADN situadas a lo largo de todo el genoma, los fragmentos son separados por electroforesis en gel de agarosa proporcionando perfiles de bandas que generalmente varían entre distintas cepas de una misma especie (Puente-Redondo *et al.* 2000). Estos perfiles se han estudiado para analizar la biodiversidad de los rhizobia de crecimiento rápido (Moschetti *et al.* 2005; Valverde *et al.* 2006).

Para la obtención de perfiles RAPD, se realizó una amplificación del ADN mediante PCR utilizando el *primer* M13 diseñado a partir de la región central del fago del mismo nombre (Schonian *et al.* 1993). Este *primer* consta de 15 pb (5' CAGGGTGGCGTTCT 3') y permite amplificar diversas regiones de ADN en condiciones poco restrictivas de PCR, y se ha comprobado que es capaz de diferenciar los aislados a nivel de cepa.

**Tabla 28. Composición de la mezcla de reacción y condiciones de la PCR para la obtención del RAPD.**

Mezcla de reacción			Condiciones de la PCR		
Compuesto	Concentración	Vol. (µl)	Fase PCR	Tiempo	Temperatura
Tampón de reacción	10X	2,5	Predesnaturalización	10'	95°C
dNTP	10 µM	0,5			
MgCl <sub>2</sub>	25 µM	5	Ciclos → 35		
Primer M13	20 µM	2	Desnaturalización	1'	94°C
BSA	0,1%	1	Anillamiento	1'	45°C
Agua milliQ		11,1	Extensión	2'	72°C
Taq polimerasa	0,5 U/µl	0,4			
ADN		2,5	Extensión final	7'	72°C
Volumen final		25		~	4°C

Para llevar a cabo la amplificación del ADN se realizó una PCR. Se ha realizado la técnica RAPD con el cebador M13. La composición de la mezcla de reacción y las condiciones de la PCR figuran en la Tabla 28. El termociclador utilizado para la PCR fue P.E. Applied Biosystem, GeneAmp®PCR System 9700.

El kit "AmpliTaq Gold reagent kit" (Perkin-Elmer Biosystems, EE.UU.) incluyó el cloruro de magnesio, el tampón PCR y la Taq polimerasa. Se utilizaron los dNTPs de Pharmacia y la seroalbúmina bovina (BSA) de Sigma.

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (120V – 70' para un gel de dimensiones 20 x 15 cm con capacidad para dos filas de 25 pocillos), para separar las diferentes bandas amplificadas y obtener los perfiles RAPD. El tampón utilizado fue TBE, cuya

composición fue Tris (100 mM) 12,11 g/l, ácido bórico (83 mM) 5,13 g/l y EDTA (1 mM) 0,37 g/l (pH 8,5). La visualización de las bandas se realizó bajo luz UV tras la inmersión del gel en solución de bromuro de etidio 0,5 µl/ml durante 30'.

### 3.5 Ensayos en campo

Objetivo 6, Fase 6 de la investigación

En los ensayos en campo se ha evaluado el efecto de los microorganismos seleccionados como PGPR recubriendo el fertilizante de fondo en condiciones reales de ecobiología del suelo. La duración de los ensayos fue de 7 meses para englobar el ciclo vegetativo completo de las plantas de trigo y cebada. La localización de los emplazamientos fue diferente, en las localidades de Carmona y Alcalá de Guadaíra en Sevilla (España) se han realizado tres ensayos con trigo, y uno con cebada en Quinta da Saúde en Beja (Portugal).

Se ha analizado la eficiencia de los fertilizantes mejorados para aplicaciones de fondo, en la producción del cultivo en términos de rendimiento y calidad de los distintos tratamientos y el efecto de dichos tratamientos sobre el cultivo en su fenología, desarrollo y producción.

Los ensayos de campo fueron llevados a cabo con la colaboración de AIMCRA en Sevilla y de ADP Fertilizantes junto con la Escuela Superior Agraria de Beja, en Portugal.

#### 3.5.1 Genotipos

El diseño experimental incluyó dos variables independientes: el genotipo (cebada *Publican*, el trigo variedad *Core*, trigo variedad *Artur Nick* y trigo variedad *Avispa*) y el tratamiento.

- La variedad de cebada *Publican* es una cebada de 2 carreras de primavera con fechas de espigado y madurez tardías, pertenece a la especie *Hordeum vulgare* var. *distichon* L.
- La variedad de trigo duro *Core* presenta un ciclo medio-corto, muy buena adaptabilidad, producción y calidad, especialmente resistente frente a condiciones de estrés.
- La variedad de trigo duro *Avispa* es una variedad de ciclo medio también muy equilibrada y de gran adaptabilidad. Ambas variedades de trigo pertenecen a la especie *Triticum durum* o *Triticum turgidum*.
- La variedad de trigo *Artur Nick* es un trigo blando de la especie *Triticum aestivum*, con un alto potencial productivo y un ciclo corto, con elevada extensibilidad.

Cada genotipo fue localizado en ambientes diferentes, eligiendo para cada uno el más adecuado para que exprese su potencial productivo de manera óptima; por consiguiente no se ha tenido en cuenta el genotipo para el posterior análisis de los resultados.

### 3.5.2 Diseño experimental de los ensayos de campo

El diseño experimental de cada parcela fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones. En Beja las dimensiones del ensayo fueron las siguientes, área total de campo 901,6 m<sup>2</sup> y área experimental de campo fue de 672 m<sup>2</sup>. El área de cada parcela consistió en 10 x 1,2 = 12 m<sup>2</sup> y el número total de parcelas fue de 36 parcelas, 9 tratamientos y cuatro repeticiones. En Sevilla, las dimensiones de la parcela elemental fueron 3 m de ancho por 10 m de largo, por lo que cada parcela elemental constaba de 30 m<sup>2</sup>, de los cuales se cosecharon los 15 m<sup>2</sup> centrales. El número de parcelas también fue 36.

### 3.5.3 Descripción de los ambientes

En la Tabla 29 se muestra la localización de los ensayos, cada emplazamiento presentó diferencias en cuanto a las características edáficas como el pH, textura, etc. (Tabla 30).

Tabla 29. Ubicación de los ensayos de campo.

Ensayo	Parcela	Localidad	Coordenadas	Tratamientos	Año
Cebada V. <i>Publican</i>	Ensayo Beja	Quinta da Saúde, Beja	38° 01' 53.02"N - 07° 52' 57.04" O Elevación 225 m	T1 a T9	2013
Trigo V. <i>Core</i>	Berengenilla	Carmona, Sevilla	37° 17' 50,6'' N – 05° 40' 20,7'' O Elevación 60 m	T1 a T9	2012/13
Trigo V. <i>Avispa</i>	Rancho Paulo	Carmona, Sevilla	37° 22' 14,3'' N – 05° 38' 04,6'' O Elevación 62 m	T1 a T9	2012/13
Trigo V. <i>Arthur Nick</i>	Algarabejo	Alcalá de Guadaira, Sevilla	37° 20' 0" N -- 5° 51' 0" Elevación 46 m	T1 a T9	2013/14

Tabla 30. Análisis del suelo utilizado para los ensayos de campo.

Análisis de suelo	Cebada V. <i>Publican</i>	Trigo V. <i>Core</i>	Trigo V. <i>Avispa</i>	Trigo V. <i>Arthur Nick</i>	
Textura	Arena (%)	70	43,3	44	
	Limo (%)	19	28,7	19	
	Arcilla (%)	11	24,5	37	
	Clase textural (USDA)	Franco-arenoso	Franco-arcillosa	Franco-arcillosa	Arcillo-arenoso
pH	7,6	8,09	8,16	8,2	
Carbonatos (% caliza)	13	12,12	10,34	17,5	
Materia orgánica (%)	1,41	1,33	1,23	1,08	
Fósforo Olsen (mg/kg)	34	6,82	6,87	9,16	
Cationes (cmol/kg)	Calcio	21,92	36,21	34,64	42,15
	Potasio	0,41	1,29	1,17	1,07
	Magnesio	4,13	5,21	4,75	3,64
	Sodio	0,19	0,16	0,15	0,39
Conductividad (dS/m)	-	0.08	0.07	0,09	

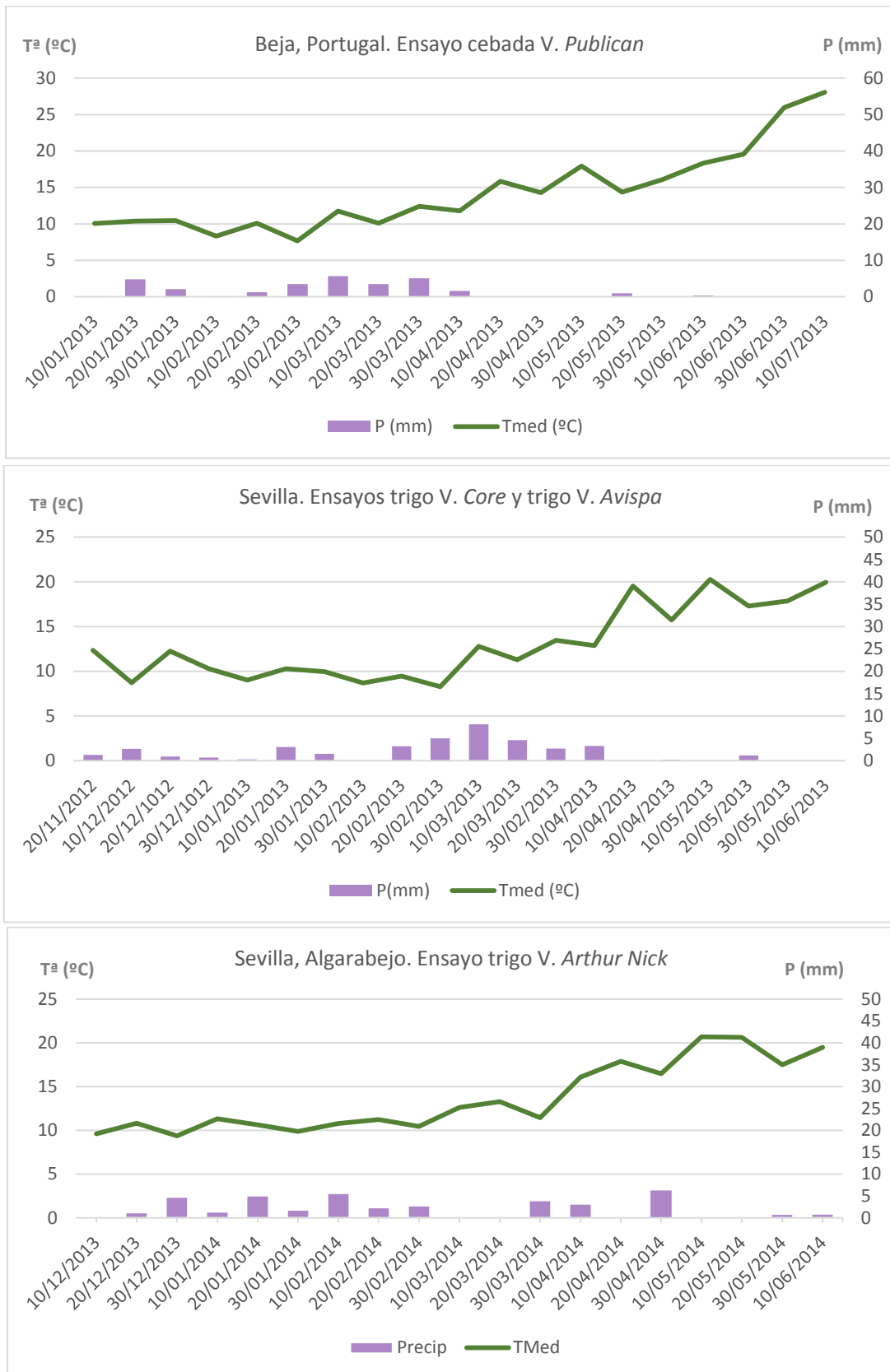


Figura 35. Gráfico de datos climáticos del ensayo de Sevilla de las parcelas de Berengenilla y Rancho Paulo (superior), de Beja en Portugal (medio) y Algarabejo (inferior) datos proporcionados por AIMCRA, ADP Fertilizantes y la Escuela Superior Agraria de Beja.

Los datos climáticos de los ensayos se detallan en varios gráficos, el ensayo de trigo *Core* (Berengenilla) y de trigo *Avispa* (Rancho Paulo) se engloban en un solo gráfico, dada la cercanía de las parcelas de estudio perteneciendo ambas a la localidad de Carmona, Sevilla (Figura 35). Para el análisis de los datos climáticos se compararon estos gráficos con datos de los últimos 30 años de Sevilla y Beja, obtenidos del AEMET (Agencia Estatal de Meteorología) y del Instituto de Meteorología de Portugal.

En Beja el cultivo de cebada *Publican* se realizó en 2013, presentándose ese año temperaturas en primavera más bajas de lo normal. El invierno fue más lluvioso de lo habitual provocando un retraso en la siembra; el final del invierno (finales de enero y febrero) fue más seco de lo normal y sólo volvió a llover más en el inicio de la primavera.

El periodo de crecimiento de los cultivos de trigo *Core* y *Avispa* en Carmona, Sevilla (finales del 2012 y 2013) fue bastante típico en cuanto a las temperaturas, salvo la segunda semana de abril y la primera de mayo que presentaron temperaturas 5 °C más altas de la media. En cuanto a las precipitaciones este periodo fue especialmente seco, las lluvias en invierno fueron prácticamente inexistentes y en primavera bastante débiles.

El ensayo de trigo *Arthur Nick* en Algarabejo, Sevilla, comenzó en diciembre de 2013 y se cosechó en junio de 2014. En este año las temperaturas fueron bastante normales en invierno con una temperatura media de 10 °C, mientras que la primavera fue más calurosa de lo normal llegando la media a 20 °C en mayo. En el invierno las precipitaciones fueron débiles, a intervalos y escasas en primavera, con periodos muy secos las primeras semanas de marzo y de mayo.

### **3.5.4 Tratamientos evaluados en los ensayos de campo**

En la preparación de los tratamientos se utilizó la misma metodología empleada en los ensayos anteriores de cámara y microcosmos, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.1.1.2, salvo que los tratamientos fueron aplicados recubriendo la superficie de los gránulos de fertilizante con caldo de cultivo al 0,5 % v/p. Las dosis de fertilizante utilizadas se calcularon en función de los análisis de suelo y las necesidades de los cultivos (Tabla 31).

Los tratamientos con el fertilizante recubierto de microorganismos fueron todos con una dosis de fertilización del 80 % de las extracciones previstas de nutrientes. Se incluyeron tres testigos: el primero sin fertilizar; el segundo fertilizado a una dosis que cubre el 100 % de las extracciones previstas de nutrientes por el cultivo; y un tercer testigo con la misma dosis de fertilización que los tratamientos con microorganismos, consistente en un 80 % de las extracciones previstas de nutrientes.

Tabla 31. Tratamientos de los ensayos de campo.

Tratamientos	Cebada <i>Publican</i> NPK 12-24-12 <sup>(2)</sup>				Trigo <i>Avispa</i> y <i>Core</i> DAP 18-46 <sup>(1)</sup>				Trigo <i>Arthur Nick</i> NPK 8-15-15 <sup>(3)</sup>			
	Dosis	N (kg/ha)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	D.	N (kg/ha)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	D.	N (kg/ha)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
1 Control sin fertilizar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 Control fertilizado al 100 %	300	15	30	15	200	36	92	0	500	40	75	75
3 Control fertilizado al 80 %	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60
4 Fertilización 80 % con C4	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60
5 Fertilización 80 % con D7	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60
6 Fertilización 80 % con B4	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60
7 Fertilización 80 % con A7	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60
8 Fertilización deficitaria 80 % con D7 + A7	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60
9 Fertilización deficitaria 80 % con D7 + B4	240	12	24	12	160	29	74	0	400	32	60	60

<sup>(1)</sup>Composición DAP Fosfato diamónico 18/46/0: 18 % nitrógeno total, 18 % nitrógeno amoniacal, 46 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 44 % fósforo soluble en agua

<sup>(2)</sup>Composición 12/24/12: 12 % nitrógeno total, 12 % amoniacal, 24 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 22,3 % fósforo soluble en agua, 12 % potasio soluble en aguay y azufre total 8 % SO<sub>3</sub>.

<sup>(3)</sup>Composición 8/15/15: 8 % nitrógeno total, 8 % amoniacal, 15 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 13,6 % fósforo soluble en agua, 15 % potasio soluble en aguay y azufre total 6 % SO<sub>3</sub>.

### 3.5.5 Resumen de actividades de los ensayos de campo

Durante los ensayos de campo se han realizado ciertos tratamientos fitosanitarios y operaciones de cultivo, además de la fertilización correspondiente, en los siguientes cronogramas se detallan las principales actividades llevadas a cabo (Figura 36).

### 3.5.6 Operaciones de cultivo

En cada parcela, el abonado de cobertera fue común para todos los tratamientos. En la siguiente tabla se exponen las cantidades aplicadas y fechas de incorporación.

Tabla 32. Tipos y dosis de abono aplicados en los abonados de cobertera.

Parcela	1ª Cobertera				2ª Cobertera			
	Abono	Kg N/ha	Dosis (Kg/ha)	Fecha	Abono	Kg N/ha	Dosis (Kg/ha)	Fecha
Cebada V. <i>Publican</i>	Nitrato de amonio 27%	68	250	14/03/13	-	-	-	-
Trigo V. <i>Core</i>	Urea 46%	69	150	07/02/13	NAC 27%	41	150	26/03/13
Trigo V. <i>Avispa</i>	Urea 46% / NAC 27% (76% / 24%)	83	200	13/02/13	NA 33,5%	52	150	13/03/13
Trigo V. <i>Arthur Nick</i>	Urea 46%	69	150	25/02/14	-	-	-	-

<b>Cebada V. <i>Publican</i> 2013</b>	<b>Ene</b>	<b>Feb</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>May</b>	<b>Jun</b>	<b>Jul</b>
Aplicación tratamientos. Recubrimiento fertilizantes 0,5 % v/p	*						
Abonado de fondo 12/24/12, 240 Kg/ha	*						
Siembra <b>cebada</b> variedad <b><i>Publican</i></b>	*						
Aplicación herbicida		*					
Abonado cobertera: 250 Kg/ha de Nitrato de amonio 27 %, carbonato cálcico 7,5 %, carbonato de magnesio 3,5 %.			*				
Aplicación fungicida			*	*	*		
Recolección y análisis de datos							*

<b>Trigo V. <i>Core</i> 2012/2013</b>	<b>Nov</b>	<b>Dic</b>	<b>Ene</b>	<b>Feb</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>May</b>	<b>Jun</b>
Aplicación tratamientos. Recubrimiento fertilizantes 0,5 % v/p	*							
Abonado de fondo DAP (18/46/0) 160 Kg/ha	*							
Siembra <b>trigo</b> variedad <b><i>Core</i></b> 210 Kg/ha	*							
Abonado de cobertera 150 kg/ha Urea			*					
Aplicación herbicida Topik				*				
Abonado de cobertera 150 kg/ha NAC 27%					*			
Aplicación fungicida Lovit						*		
Recolección y análisis de datos								*

<b>Trigo V. <i>Avispa</i> 2012/2013</b>	<b>Nov</b>	<b>Dic</b>	<b>Ene</b>	<b>Feb</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>May</b>	<b>Jun</b>
Aplicación tratamientos. Recubrimiento fertilizantes 0,5 % v/p	*							
Abonado de fondo DAP (18/46/0), 160 Kg/ha	*							
Siembra <b>trigo</b> variedad <b><i>Avispa</i></b> 215 Kg/ha	*							
Abonado de cobertera: 200 kg/ha de Urea 76 % y Nitrato amónico 24 %			*					
Aplicación herbicida Traxos				*				
Abonado de cobertera 150 kg/ha Nitrato amónico 34,5%					*			
Aplicación fungicida Escolta						*		
Recolección y análisis de datos								*

<b>Trigo V. <i>Arthur Nick</i> 2013/2014</b>	<b>Nov</b>	<b>Dic</b>	<b>Ene</b>	<b>Feb</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>May</b>	<b>Jun</b>
Aplicación tratamientos. Recubrimiento fertilizantes 0,5 % v/p		*						
Abonado de fondo 8/15/15, 400 Kg/ha	*							
Siembra <b>trigo</b> variedad <b><i>Artur Nick</i></b> 215 Kg/ha		*						
Abonado de cobertera: 200 kg/ha de Urea 76 % y Nitrato amónico 24 %				*				
Aplicación herbicida Biplay, Topik				*				
Aplicación fungicida Folicur					*			
Recolección y análisis de datos								*

Figura 36. Cronogramas de los ensayos de campo. Principales actividades realizadas en los ensayos de campo.



El cultivo precedente al cultivo del ensayo en las parcelas fue de girasol en Rancho Paulo y en Algarabejo, y de barbecho en las dos restantes. Las fechas exactas de los tratamientos fitosanitarios, de la fertilización y de las operaciones de cultivo se detallan en la Tabla 33.

**Tabla 33. Datos de los cultivo en los ensayos en campo.**

Datos del ensayo	Trigo Core	Trigo Avispa	Cebada Publican	Trigo Artur Nick
Cultivo anterior	Barbecho	Girasol	Barbecho	Girasol
Abonado de fondo	23/11/12	23/11/12	04/01/13	21/11/13
Fecha de siembra	29/11/12	01/12/12	04/01/13	12/12/13
Dosis de siembra (Kg/ha)	210	215	205	220
Abonado de cobertera	07/02/13 26/03/13	13/02/13 13/03/13	14/03/13	25/02/14
Aplicaciones fungicida	15/04/13	13/03/13	18/03/13 08/04/13 03/05/13	20/03/2014
Aplicación herbicida	15/02/13	07/03/13	01/02/13	25/02/14
Fecha de recolección	10/06/13	10/06/13	10/07/13	02/06/14

### 3.6 Evaluación económica y ambiental

En la evaluación económica se definen los siguientes parámetros:

- Unidades Fertilizantes Totales (UFT): se define como la suma de los kg de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O aplicados al cultivo incluyendo el abonado de fondo y de cobertera.
- Coste del fertilizante: se calculó como la suma del coste de las aplicaciones de fertilizantes en fondo y en cobertera, para los precios unitarios indicados en la Tabla 34.
- Precio de la cosecha: se ha calculado a partir de los precios medios para el cereal que figuran en la Tabla 34.
- Eficiencia: se define como los kg/ha de cosecha entre las UFT/ha, y en la eficiencia relativa se toma como referencia (100 %) el control fertilizado al 80 %.

**Tabla 34. Precios de los fertilizantes y del grano de cereal en España durante la campaña 2013/2014. (Datos del MAGRAMA)**

Fertilizantes €/100 kg		Cereales €/t	
DAP 18/46/0	51,32	Trigo blando	234,81
12/24/12	39,12		
8/15/15	35,20		
NAC 27	29,16	Trigo duro	251,44
NA 34,5	38,84		
Urea 46 %	42,26	Cebada	204,19

- Incremento del rendimiento económico por UFT, se define como:

$$\Delta \text{Rendimiento económico/UFT} = \frac{M.B. \text{ del tratamiento} - M.B. \text{ de referencia (Control fertilizado 80 \%)}}{\text{Gasto en fertilizante}}$$

*M.B: Margen Bruto*

En la evaluación ambiental se define como huella de carbono a los kg de CO<sub>2</sub> equivalente por tonelada de grano producido. Este dato se calcula sumando las emisiones de CO<sub>2</sub> globales del cultivo sin considerar las atribuibles a los fertilizantes (Tabla 35), sumando las emisiones propias de la fertilización.

**Tabla 35. Emisiones fijas del cultivo del cereal (Altuna et al. 2011)**

	Emisiones de CO <sub>2</sub> (Kg de CO <sub>2</sub> Eq / t)	
	Trigo	Cebada
Gasoil	28,78	26,35
Aceite	0,10	0,07
Fitosanitarios	1,03	1,49
Semilla	14,33	12,56
Riego	0	0
Emisiones del suelo	179,09	134,95
Emisiones coche agricultor	1,83	1,38
<b>TOTAL</b>	<b>225,2</b>	<b>176,8</b>

Para el cálculo de las emisiones de CO<sub>2</sub> correspondientes a la fertilización, se ha utilizado el programa Carbon Footprint Calculator (Versión 2.0) (Fertilizers Europe 2014). Este programa estima las emisiones en t de CO<sub>2</sub> equivalentes / t de producto e incluye emisiones directas e indirectas, a partir de las materias primas hasta el producto final. Ciertas producciones pueden tener emisiones de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y de metano (CH<sub>4</sub>), para ello el programa utiliza la siguiente conversión:

- 1 Kg de N<sub>2</sub>O equivale a 298 kg de CO<sub>2</sub> equivalente.
- 1 Kg de CH<sub>4</sub> equivale a 25 kg de CO<sub>2</sub> equivalente.

El programa informático tomó los datos del Cuarto informe de Evaluación del IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change (2007). Las especificaciones seleccionadas en el programa fueron las indicadas en la Tabla 36

**Tabla 36. Valores fijos para el cálculo de emisiones de CO<sub>2</sub> equivalentes de los fertilizantes.**

Especificaciones (kg de CO <sub>2</sub> / GJ)	
Energía (Gas natural, media europea)	56,110
Electricidad (Media europea)	97,834
Vapor (Caldera vapor, cogeneración)	60,311

Se estima que la huella de carbono de la producción e incorporación del inoculante bacteriano sería el 10 % de la huella de carbono de la producción de fertilizante y dado que el recubrimiento se realiza al 0,5 % p / v, tan sólo aumentaría la huella de carbono de un fertilizante mejorado un 0,05 %.

### 3.7 Técnicas analíticas

#### 3.7.1 Análisis de material vegetal

La **biomasa aérea** se cortó a 0,5 cm del suelo y se pesaron para obtener el peso fresco. El secado de las muestras se realizó durante 72 h a 70 °C de temperatura, y se pesaron para obtener el peso seco. A continuación, se trituraron con un molino de martillos (Figura 37). El material vegetal fue analizado por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (LTI-ULE).

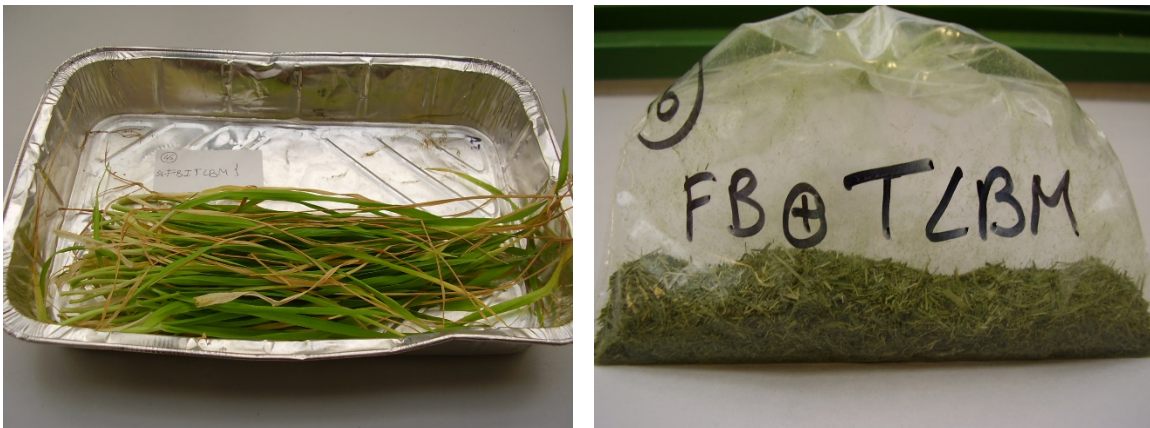


Figura 37. Procesado de las muestras de biomasa aérea de trigo, plantas preparadas para el secado (izquierda) y muestra tras el triturado (derecha).

En la cosecha realizada en los ensayos de campo se utilizaron 15 m<sup>2</sup> del centro de cada unidad experimental para determinar el rendimiento total, la humedad y el peso específico.

Respecto a la **biomasa en cosecha**, se tomaron muestras en cada unidad experimental, siendo en total 72 muestras (9 tratamientos x 4 repeticiones, 36 muestras/ensayo x 2 parcelas). Se analizó la producción del cultivo en los distintos ambientes en términos de rendimiento y calidad de los distintos tratamientos, y el efecto de dichos tratamientos sobre el cultivo en su fenología y desarrollo, acumulación de biomasa y extracciones.

El grano se analizó y se realizó un análisis de rendimientos y calidad. El análisis químico del grano se realizó en el LTI-ULE, se determinó el contenido de N (%) mediante el método Kjeldahl, y P, K, Ca, Mg (mg/g) mediante digestión con ácido nítrico al 65 % a 200 °C durante 20 minutos y, seguidamente, la determinación de la cantidad de cada elemento mediante espectroscopía de emisión atómica ICP-AES.

### 3.7.2 Análisis de suelo

Para la elección del **suelo** en los distintos ensayos, se han tomado muestras de diferentes parcelas y se ha analizado el contenido en materia orgánica, nitrógeno en forma nítrica y fósforo. Una vez seleccionado el suelo a utilizar, se han realizado análisis más a fondo determinando la textura (contenido en arena, limo y arcilla), el pH, el contenido en carbonatos, materia orgánica, fósforo Olsen y cationes calcio, potasio, magnesio y sodio, y finalmente la conductividad. En los ensayos de campo, antes de aplicar el abonado de fondo, se tomó una muestra de suelo por cada unidad experimental para su análisis físico/químico.

Los análisis de suelo en los ensayos de campo fueron llevados a cabo por el SIDDRA (Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación de Abonado) y la metodología seguida en los análisis químicos del suelo fue la siguiente:

- Textura: densímetro Bouyoucos.
- Conductividad y pH: potenciometría.
- Carbonatos: calcímetro Bernard.
- Caliza: método Drouineau.
- Materia Orgánica: método Walkley-Black.
- Fósforo olsen: método Olsen.
- Na y K: fotometría de llama.
- Ca y Mg: espectrofotometría UV/VIS.

### 3.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados, se realizaron mediante el análisis de la varianza o ANOVA para los parámetros biomasa seca y altura de la planta. También se ha realizado una prueba post-hoc que nos permite saber si existen diferencias entre las medias de los grupos estudiados, en este caso utilizando la Diferencia Mínima Significativa  $p < 0,05$ . Para llevar a cabo estos análisis se ha utilizado el programa SPSS versión 19.0.

En los ensayos de campo el análisis estadístico realizado por genotipos fue mediante ANOVA para los resultados obtenidos de cada uno de los genotipos, utilizando como única variable independiente los tratamientos.

## **4 Resultados**



## 4.1 Supervivencia y efecto en planta de los rizobios cuando se aplican al abono o a la semilla en microcosmos

En este ensayo se ha analizado la supervivencia de los microorganismos, aplicados directamente sobre el gránulo de abono o como recubrimiento de la semilla con turba esterilizada como soporte. Además se ha analizado el efecto de dichos microorganismos en plantas de trigo bajo condiciones controladas.

### 4.1.1 Supervivencia

En el **recuento de microorganismos** del suelo se han obtenido colonias de crecimiento bacteriano en las diluciones decimales  $10^{-1}$  (Figura 38. A),  $10^{-2}$  (Figura 38. B),  $10^{-3}$  (Figura 38. C) y  $10^{-4}$  (Figura 38. D). La morfología de las colonias obtenidas fue similar a las colonias de los rizobios inoculados inicialmente, caracterizadas por una textura mucosa, blanquecina, transparente y de superficie brillante. La comprobación de la correspondencia entre los microorganismos aislados y los microorganismos inoculados inicialmente se ha realizado mediante la metodología del Número Más Probable (NMP) determinado sobre planta de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) (Tabla 38).

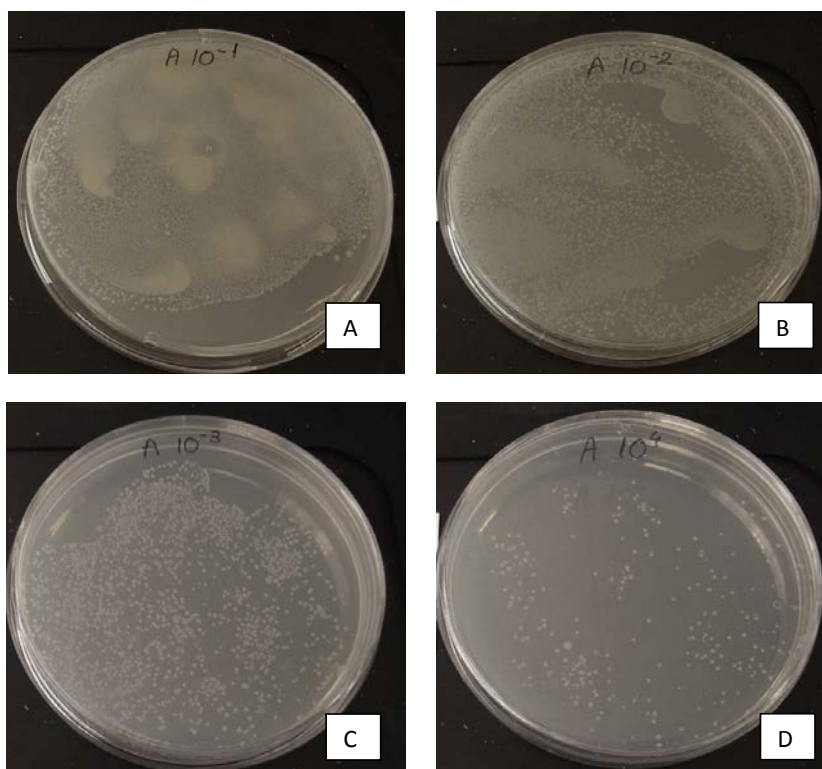


Figura 38. Observación del crecimiento de colonias microbianas en placas con medio YMA, inoculadas con diluciones decimales  $10^{-1}$  (A),  $10^{-2}$  (B),  $10^{-3}$  (C) y  $10^{-4}$  (D) de suelo previamente esterilizado, al final del experimento. El tratamiento seleccionado para la figura fue Fertilizante recubierto con B4.

## Resultados

Para el análisis de la supervivencia de *Rhizobium* mediante el Número Más Probable, al final del experimento se utilizó el suelo inicialmente inoculado en plantas trampa de alubia, y se observó que en todos los tratamientos (Tabla 11), la cepa de *Rhizobium leguminosarum* B4 fue recuperada del suelo tras el experimento, a concentraciones que oscilaron entre 6 y 100 rizobios infectivos / g de suelo (Tabla 37).

**Tabla 37. Resultados del número más probable (NMP) de rizobios en el suelo, al final del experimento, para suelo inicialmente esterilizado.**

Tratamiento	Códigos	Dilución				Plantas noduladas	NMP (Rizobios / g suelo)
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
15-35-0+Zn recubierto con <i>R. leguminosarum</i> B4	F-R	4	3	0	0	7	100
Semilla recubierta con <i>R. leguminosarum</i> B4.	S-R	3	3	1	0	7	100
Semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes.	S-RB	4	0	0	0	4	17
15-35-0+Zn y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	F + SR	2	0	0	0	2	6
15-35-0+Zn y semilla con mezcla de los dos inoculantes	F + SRB	2	2	0	0	4	17
Control sin fertilizar	C	0	0	0	0	0	No existen

Las alícuotas de suelo utilizadas para inocular *Phaseolus vulgaris* provenientes de los distintos tratamientos utilizados en el ensayo, han sido capaces de nodular las plantas trampa en todos los casos, salvo el control sin fertilizar el cual no contenía microorganismos.

La utilización del tratamiento F-R (propio fertilizante como soporte para las cepas de rizobios *Rhizobium leguminosarum* B4-15-35-0+Zn), permite alcanzar los valores más altos de supervivencia de las bacterias, junto con el tratamiento con la semilla recubierta con la cepa B4 de *R. leguminosarum*.

### 4.1.2 Efecto en planta en suelo estéril

En la tabla de los resultados del ANOVA para cada uno de los parámetros analizados (Tabla 38) se observa que existen diferencias altamente significativas para los dos parámetros analizados.

**Tabla 38. ANOVA de las variables dependientes biomasa aérea y altura de la planta, en el ensayo sobre suelo estéril.**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Biomasa aérea seca	3449100,000	11	313582,213	130,666	0,000
Altura de la planta	331324,130	11	30120,375	2206,456	0,000

Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos (Tabla 17) S-RB, F-R y S-B mejoran los datos de biomasa aérea seca superando al CF, pero las diferencias no fueron significativas. Además el tratamiento S-R supera en un 12,6 % al C (Tabla 39).



En el análisis de los resultados en altura de la planta también existe mejora del tratamiento F-R sobre el CF sin microorganismos (Tabla 39).

**Tabla 39. Prueba post-hoc para la variable dependiente biomasa aérea seca y altura de la planta (Diferencia Mínima Significativa respectivamente  $p < 0,05$ ).**

Tratamientos	Códigos	Peso seco (mg / planta)	Test DMS	Altura (cm / planta)	Test DMS
15-35-0+Zn y semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	F + SRB	81,48	c	30,93	c
15-35-0+Zn y semilla recubierta con <i>R. leguminosarum</i> B4	F + SR	83,77	c b	29,99	cd
Control sin fertilizar	C	85,15	c b	32,94	ab
15-35-0+Zn y semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp.	F + SB	88,07	c b	30,51	cd
Semilla recubierta con <i>Rhizobium leguminosarum</i> B4	S-R	97,45	c b a	30,65	cd
15-35-0+Zn recubierto con <i>Burkholderia</i> sp.	F-B	105,14	c b a	31,74	cb
15-35-0+Zn recubierto con mezcla de las dos cepas	F-RB	107,37	b a	33,49	ab
Control fertilizado con 15-35-0+Zn	CF	115,68	a	34,06	a
Semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	S-RB	115,86	a	29,20	d
15-35-0+Zn recubierto con <i>R. leguminosarum</i> B4	F-R	117,03	a	34,21	a
Semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp.	S-B	117,18	a	30,34	cd

- Tratamientos de fertilizante y semilla recubierta con turba (F + S): fueron los que dieron los valores más bajos de peso seco, incluso inferiores al control sin fertilizar C, salvo en el caso de *Burkholderia* sp. F + SB, si bien las diferencias entre estos tratamientos no fueron estadísticamente significativas.
- Tratamientos de semilla recubierta sin fertilizante (S-): el tratamiento S-B obtuvo el valor más elevado de peso seco, superando junto con el tratamiento S-RB al CF. Sin embargo, S-R quedó por debajo de dicho control CF, pero por encima del C.
- Tratamientos de fertilizante recubierto con microorganismos (F-): el F-B o F-RB presentaron valores más bajos de peso seco que el CF. Por el contrario, el F-R mejoró dicho control, si bien las diferencias entre tratamientos fertilizados no llegaron a ser significativas.

En todos los casos, se observó que la inoculación directa del fertilizante dio lugar a mayor valor de peso seco que la inoculación de la semilla con abonado sin inocular.

La altura de la planta no estuvo directamente relacionada con la biomasa producida. Se volvió a observar que la inoculación del fertilizante da mejores valores que la inoculación de la semilla con abonado sin inocular.

### 4.1.3 Efecto en planta en suelo real

Este ensayo consistió en evaluar el efecto de los microorganismos en el desarrollo vegetativo del trigo, al ser aplicados sobre el fertilizante o directamente en la semilla. Se analizó el contenido en nutrientes y los parámetros vegetativos de biomasa aérea. En este ensayo se pretende analizar la efectividad de los microorganismos sobre el gránulo de abono frente a la inoculación con turba sobre la semilla.

#### 4.1.3.1 Contenido de N, P, K, Ca y Mg en la biomasa, 70 días después de la siembra.

El análisis de la composición en N, P, K, Ca y Mg de la parte aérea de las plantas de trigo no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 40) en ningún nutriente ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 40. ANOVA de las variables dependiente contenido de N, Mg, Ca, P y K en la biomasa para el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 70 días después de la siembra.**

Parámetro determinado	gl	Media cuadrática	F	Sig.
N Kjeldahl %	14	0,064	1,669	0,117
Mg (mg/kg)	14	31877,956	0,706	0,751
Ca (mg/kg)	14	239762,980	0,911	0,558
P (mg/kg)	14	437429,755	1,534	0,159
K (mg/kg)	14	1,498 107	0,765	0,696

A pesar de no existir diferencias significativas, un dato que llama la atención por repetirse para todos los elementos nutritivos, es que comparando el CFI y el tratamiento S-R, la concentración en la biomasa aérea de todos los nutrientes presentó una clara tendencia al alza de los valores del tratamiento inoculado (Tabla 41).

**Tabla 41. Valores medios de la concentración de elementos en la biomasa seca, en el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 70 días después de la siembra.**

Tratamiento	Códigos	N	Mg	Ca	P	K
		Kjeldahl (%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
NAC 27 % y semilla con <i>Burkholderia</i> sp.	FII + SB	0,997	796	1851	1643	20917
NAC 27 % y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	FII + SR	1,043	692	1909	1237	22658
15-35-0+Zn y semilla con <i>Burkholderia</i> sp.	FI + SB	1,080	984	2402	2211	23391
NAC 27 % y semilla con mezcla de las dos cepas	FII + SRB	1,083	873	2179	1579	21864
Control sin fertilizar	C	1,133	826	2229	1769	19949
Control fertilizado NAC 27%	CFII	1,183	837	2333	1551	21062
15-35-0+Zn y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	FI + SR	1,257	931	2304	2307	25046
15-35-0+Zn y semilla con mezcla de las dos cepas	FI + SRB	1,260	943	2202	2266	23041
Semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp.	S-B	1,267	829	2162	1869	21352
15-35-0+Zn recubierto con <i>Burkholderia</i> sp.	F-B	1,277	984	2246	2227	23799
Semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	S-RB	1,330	910	2517	2148	24396
Control fertilizado 15-35-0+Zn	CFI	1,347	1038	2744	2443	26462
15-35-0+Zn recubierto con mezcla de las dos cepas	F-RB	1,427	1010	2641	2111	23017
15-35-0+Zn recubierto con <i>R. leguminosarum</i> B4	F-R	1,433	960	2449	2286	26101
Semilla recubierta con <i>R. leguminosarum</i> B4	S-R	1,447	1086	2882	2559	27694

- Tratamientos de fertilizante recubierto con microorganismos (F-): el F-R sólo mejora el contenido en N en la biomasa aérea.
- Tratamientos de semilla recubierta sin fertilizante (S-): el S-R presentó una clara tendencia al alza en todos los nutrientes.
- Tratamiento de fertilizante y semilla recubierta con microorganismos (FI +): dan valores menores que el CFI.

El fertilizante 15-35-0+Zn alcanza en general, valores más elevados de concentraciones de los elementos analizados en la biomasa seca, que con el NAC del 27 %, incluso en el caso del Nitrógeno. (Tabla 42).

**Tabla 42. Valores medios del contenido total de nutrientes en la biomasa de la planta, en el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 70 días después de la siembra.**

Tratamiento	Códigos	N	Mg	Ca	P	K
		(mg/planta)				
Semilla recubierta con <i>R. leguminosarum</i> B4	S-R	4,461	0,331	0,890	0,783	8,535
Control sin fertilizar	C	4,738	0,341	0,927	0,717	8,186
15-35-0+Zn recubierto con mezcla de las dos cepas	FI-RB	5,586	0,439	1,117	0,893	10,109
Semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	S-RB	5,629	0,392	1,075	0,937	10,590
Semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp.	S-B	5,649	0,360	0,948	0,810	9,190
Control fertilizado 15-35-0+Zn	CFI	6,111	0,452	1,189	1,048	11,415
15-35-0+Zn y semilla con mezcla de las dos cepas	FI + SRB	6,799	0,396	0,978	0,969	10,505
15-35-0+Zn recubierto con <i>R. leguminosarum</i> B4	FI-R	6,980	0,442	1,101	0,987	12,102
15-35-0+Zn y semilla con <i>Burkholderia</i> sp.	FI + SB	7,430	0,648	1,593	1,432	16,081
NAC 27 % y semilla con <i>Burkholderia</i> sp.	FII + SB	8,167	0,649	1,515	1,325	17,215
Control fertilizado NAC 27%	CFII	9,251	0,655	1,876	1,184	16,231
15-35-0+Zn recubierto con <i>Burkholderia</i> sp.	FI-B	9,436	0,667	1,591	1,537	17,532
15-35-0+Zn y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	FI + SR	9,680	0,676	1,664	1,689	21,777
NAC 27 % y semilla con mezcla de las dos cepas	FII + SRB	9,947	0,790	1,970	1,425	10,019
NAC 27 % y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	FII + SR	11,437	0,750	2,011	1,301	25,713

- Tratamientos con el fertilizante NAC 27 % (FII +): presentaron un mayor contenido total de nitrógeno por planta. En cuanto al contenido total de fósforo en la biomasa, el tratamiento FII + SR ha presentado un contenido 10 % mayor que el CFII. Los tratamientos FII + SR y FII + SRB superaron en nitrógeno / planta al CFII. El tratamiento con *Burkholderia* FII + SB presentó menores resultados que el CFII. Los tratamientos fertilizados con las semillas inoculadas de manera individual como la mezcla, han presentado en todos los casos valores superiores al CFI.
- Tratamientos con la semilla recubierta de microorganismos: S-R, S-RB y S-B presentaron los valores más bajos en contenido de nitrógeno de la tabla, incluso el S-R ha presentado valores menores que el C. También la inoculación con la cepa solubilizadora de fosfato (B4) ha tenido un efecto en el contenido de fósforo en planta en el tratamiento FI + SR superando el CFI en un 61 %. El tratamiento S-R los resultados han dado un menor contenido en fósforo en la biomasa que el CFI.

## Resultados

### 4.1.3.2 Análisis de los parámetros vegetativos evaluados a los 95 días de la siembra

La Tabla 43 presenta los resultados del ANOVA para los dos parámetros analizados. En ambos casos existieron diferencias significativas entre tratamientos, para  $p < 0,01$ .

**Tabla 43. ANOVA de las variables dependientes biomasa fresca y seca, en el ensayo de microcosmos en invernadero sobre suelo no estéril, 95 días después de la siembra.**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Biomasa fresca (g por planta)	18,639	14	1,331	3,679	0,001
Biomasa seca (g por planta)	2,531	14	0,181	3,223	0,003

Los valores más altos de biomasa fresca y seca (Tabla 44), se observaron cuando se utilizó como fertilizante nitrato amónico cálcico 27 %, y los más bajos para los controles sin fertilizar. Los tratamientos que llevan el fertilizante 15-35-0+Zn se situaron en la parte media de la tabla. En primer lugar hay que destacar que no se observó un claro escalonamiento de los resultados, lo que se traduce en que las diferencias significativas solo se encuentren entre los valores extremos, no existiendo entre éstos y los intermedios.

El tratamiento 15-35-0+Zn recubierto con *Rhizobium leguminosarum* B4 (FI-R) supera en biomasa fresca al Control fertilizado 15-35-0+Zn (CFI) pero sin diferencias significativas. En los controles del ensayo los tratamientos semilla recubierta con *Rhizobium leguminosarum* B4 - turba (S-R) y semilla con mezcla de los dos inoculantes - turba (S-RB) mejoran los resultados respecto al Control sin fertilizante y sin microorganismos C. Por último, el tratamiento que mejores resultados presentó fue el tratamiento NAC 27 % y semilla con *R. leguminosarum* B4 - turba FII + SR.

**Tabla 44. Prueba post-hoc para los valores medios de la variable dependiente biomasa fresca y biomasa seca 95 días después de la siembra (Diferencia Mínima Significativa respectivamente  $p < 0,05$ ). Los datos están ordenados de menor a mayor biomasa seca.**

Tratamiento	Códigos	Biomasa fresca (mg / planta)	Test DMS	Biomasa seca (mg / planta)	Test DMS
Control sin fertilizar	C	1586,7	f	450,0	e
Semilla recubierta con <i>R. leguminosarum</i> B4	S-R	1636,7	f	453,3	e
Semilla recubierta con mezcla de los dos inoculantes	S-RB	1793,3	fe	460,0	e
15-35-0+Zn y semilla con mezcla de las dos cepas	FI + S-RB	1863,3	fe	546,7	ed
Control fertilizado 15-35-0+Zn	CFI	2106,7	fed	596,7	edc
Semilla recubierta con <i>Burkholderia</i> sp.	S-B	2003,3	fe	606,7	edc
15-35-0+Zn recubierto con la mezcla de las dos cepas	FI-RB	2040,0	fed	610,0	edc
15-35-0+Zn y semilla con <i>Burkholderia</i> sp.	FI + S-B	2140,0	fed	633,3	edc
15-35-0+Zn y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	FI + S-R	2276,7	fedc	706,7	edcb
15-35-0+Zn recubierto con <i>R. leguminosarum</i> B4	FI-R	2130,0	fed	766,7	edcb
15-35-0+Zn recubierto con <i>Burkholderia</i> sp.	FI-B	2656,7	edcb	833,3	edcb
Control fertilizado NAC 27%	CFII	3433,3	ba	930,0	dcba
NAC 27 % y semilla con <i>Burkholderia</i> sp.	FII + SB	3036,7	dcba	990,0	cba
NAC 27 % y semilla con mezcla de las dos cepas	FII + SRB	3186,7	cba	1053,3	ba
NAC 27 % y semilla con <i>R. leguminosarum</i> B4	FII + SR	3680,0	a	1273,3	a

La inoculación de la semilla produjo mayor valor de biomasa, tanto fresca como seca, que el C. Igualmente, en los tratamientos fertilizados con FI ó con FII, la inoculación de la semilla dio lugar a una mayor producción de biomasa, salvo en el tratamiento FI + S-RB.

La inoculación del fertilizante dio como resultado una mayor producción de biomasa en todos los casos. No se observó una mejora clara de un inóculo concreto respecto a los otros inóculos empleados.

#### 4.1.4 Análisis comparativo de los resultados obtenidos en suelo esterilizado y sin esterilizar para el tratamiento control fertilizado 15-35-0+Zn y los tratamientos inoculados

Las conclusiones se presentan en la Tabla 45, que compara los resultados obtenidos en el tratamiento Control que utiliza el fertilizante 15-35-0+Zn (CFI), con los que se obtuvieron para el fertilizante recubierto con la cepa B4 (FI-R), el fertilizante recubierto con *Burkholderia* sp. (FI-B) y el tratamiento con el fertilizante recubierto por la mezcla (FI-RB).

El FI-R es el tratamiento microbiano que mejores resultados ha presentado. El FI-B ha presentado menores valores en el caso del ensayo en suelo estéril, que en el ensayo en microcosmos; en el cual, los parámetros de crecimiento presentaron mejores resultados que el contenido en nutrientes de la biomasa. En cuanto a la mezcla de microorganismos (FI-RB) ha presentado mejores resultados que FI-B, pero no supera al FI-R.

**Tabla 45. Conclusiones de la comparación entre los resultados obtenidos en el control fertilizado 15-35-0+Zn y el tratamiento del mismo abono recubierto con los microorganismos individualmente y mezclados.**

Ensayo	Parámetro evaluado	Tratamiento			
		CFI Control Fertilizado 15-35-0 + Zn	FI-R 15-35-0 + Zn + <i>R. leguminosarum</i>	FI-B 15-35-0 + Zn + <i>Burkholderia</i> sp.	FI-RB 15-35-0 + Zn + <i>R. leguminosarum</i> + <i>Burkholderia</i> sp.
Ensayo sobre suelo esterilizado	Supervivencia en suelo estéril del microorganismo	No aplicable	100 rizobios por g de suelo. La más alta de todos los tratamientos	No aplicable	No aplicable
	Biomasa aérea en el estado fenológico de 3 hojas.	d	D	d	D
	Altura de la planta en el estado fenológico de 3 hojas	d	D	d	d
Ensayo de microcosmos en invernadero	Biomasa aérea fresca 95 DDS*	d	D	D	D
	Biomasa aérea seca 95 DDS*	d	D	D	D
	Contenido N en la biomasa aérea, 70 DDS*	d	D	d	D
	Contenido P, K, Ca, Mg en la biomasa aérea, 70 DDS*	D	d	d	d

\*DDS: Días después de la siembra; \* "D" significa tratamiento dominante o superior y "d" tratamiento dominado o inferior

## Resultados

En dicha tabla se utiliza un código que emplea la letra minúscula “d” para indicar el tratamiento que resulta inferior (“dominado”) y la letra mayúscula “D” para indicar el tratamiento que resulta superior (“Dominante”). Esta valoración está basada en tendencias y no en diferencias significativas.

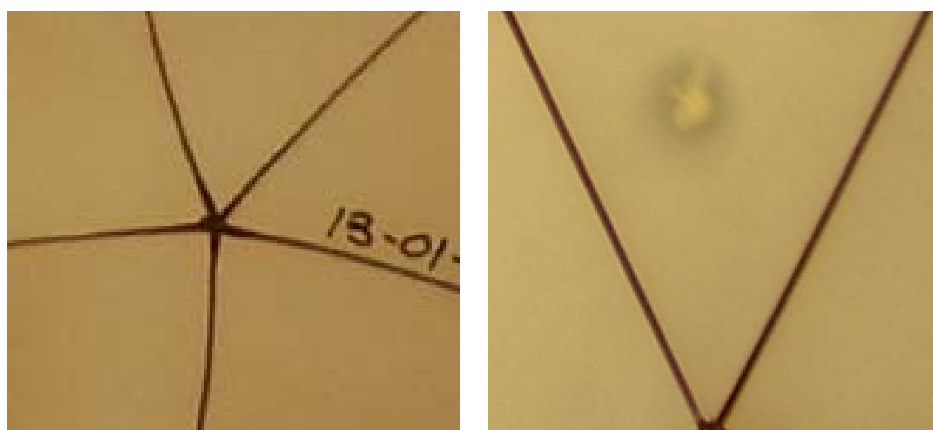
Los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia de los microorganismos han sido favorables en todos los casos, además el efecto de dichos microorganismos provoca una mejora en el desarrollo de la biomasa aérea. Por ello, se continuó ampliando la investigación mediante el análisis *in vitro* de las propiedades PGPR.

### **4.2 Pruebas PGP (Plant Growth Promoting) “in vitro” para la selección de cepas de rizobios**

Las siguientes pruebas se realizaron para seleccionar aquellos microorganismos que presentaron un mayor efecto PGPR “in vitro”, y posteriormente, evaluar en planta tan sólo los microorganismos seleccionados. Existen múltiples efectos PGPR, pero se han seleccionado para su evaluación los de mayor interés a nivel agronómico: la capacidad de solubilización de fósforo, la producción de la auxina ácido indolacético ó IAA, la producción de sideróforos y la actividad ACC desaminasa.

#### **4.2.1 Solubilización de P**

Los resultados de la prueba de solubilización de fosfato (Figura 39), realizada a la colección completa de rizobios fue negativa en casi todos los casos excepto en las cepas B4 y B3.



**Figura 39. Placa Petri de medio YED-P con cepas de Rhizobium que presentaron resultados negativos (izquierda) y una de las dos cepas que dieron positivo en la solubilización de fosfato (derecha).**

#### 4.2.2 Producción de ácido indolacético

La Tabla 46 presenta los resultados de producción de IAA para todas las cepas incluidas en el estudio, tanto en valores absolutos ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) como relativizados respecto de la densidad de bacterias, es decir en  $\mu\text{g} / 10^8 \text{ UFC}$ . Se resaltan las cepas seleccionadas por el criterio producción de IAA.

**Tabla 46. Producción de IAA para las cepas incluidas en el estudio. Valores medios de tres determinaciones por cepa.**

Bacteria	DO media 600 nm	UFC / ml	$\mu\text{g}$ de IAA / mL	$\mu\text{g}$ de IAA / $10^8$ UFC
C4	0,093	8663793,1	1,005	11,6
C6	0,097	9026315,8	1,029	11,4
D7	0,145	13866071,4	1,553	11,2
C3	0,119	11311111,1	1,018	9,0
C9	0,127	12155844,2	0,936	7,7
A4	0,138	13232876,7	0,966	7,3
D1	0,149	14208333,3	1,023	7,2
D9	0,116	10867647,1	0,739	6,8
A11	0,144	13731343,3	0,920	6,7
A7	0,200	19421875,0	1,243	6,4
A2	0,244	23718750,0	1,518	6,4
C12	0,170	16383333,3	0,983	6,0
A8	0,204	19740740,7	1,066	5,4
E1	0,208	20306122,4	0,995	4,9
E2	0,261	25319148,9	1,190	4,7
C2	0,262	25340909,1	1,115	4,4
D10	0,283	27487804,9	1,127	4,1
B5	0,274	26700000,0	1,068	4,0
C14	0,251	24368421,1	0,926	3,8
C10	0,260	25078947,4	0,953	3,8
C6	0,300	29297297,3	1,084	3,7
D5	0,220	21583333,3	0,777	3,6
A5	0,369	36472222,2	1,313	3,6
E3	0,203	19742857,1	0,691	3,5
D3	0,206	19914285,7	0,697	3,5
D6	0,310	30028571,4	1,051	3,5
B2	0,277	26800000,0	0,938	3,5
D8	0,180	17151515,2	0,566	3,3
A6	0,220	21000000,0	0,693	3,3
C7	0,294	28709677,4	0,890	3,1
C16	0,341	34000000,0	1,020	3,0
C13	0,355	34517241,4	1,001	2,9
A12	0,230	22642857,1	0,634	2,8
C15	0,495	48592592,6	1,312	2,7
D4	0,283	27185185,2	0,734	2,7
C1	0,308	29592592,6	0,799	2,7
LEV 0602	0,262	25240000,0	0,631	2,5
LPA 1417	0,279	26720000,0	0,668	2,5
LEV 0607	0,350	34809523,8	0,731	2,1
A4	0,349	34350000,0	0,687	2,0
LCS 0305	0,424	41350000,0	0,827	2,0
LET 1912	0,271	26050000,0	0,521	2,0
LBM 1209	0,270	26210526,3	0,498	1,9
LPA 1410	0,293	28722222,2	0,517	1,8
LBM 1113	0,271	25833333,3	0,465	1,8
LBM 0201	0,313	30470588,2	0,518	1,7
B4	0,145	14100000,0	0,141	1,0

## Resultados

La cantidad de IAA sintetizada por las distintas cepas bacterianas está directamente relacionada con la intensidad del color rosáceo (Figura 40) y se determinó midiendo la absorbancia a 535 nm. Las distintas cepas se analizaron por triplicado y finalmente para la obtención de los datos en  $\mu\text{g}$  de IAA / ml se elaboró una curva patrón a partir de concentraciones estándar de IAA.

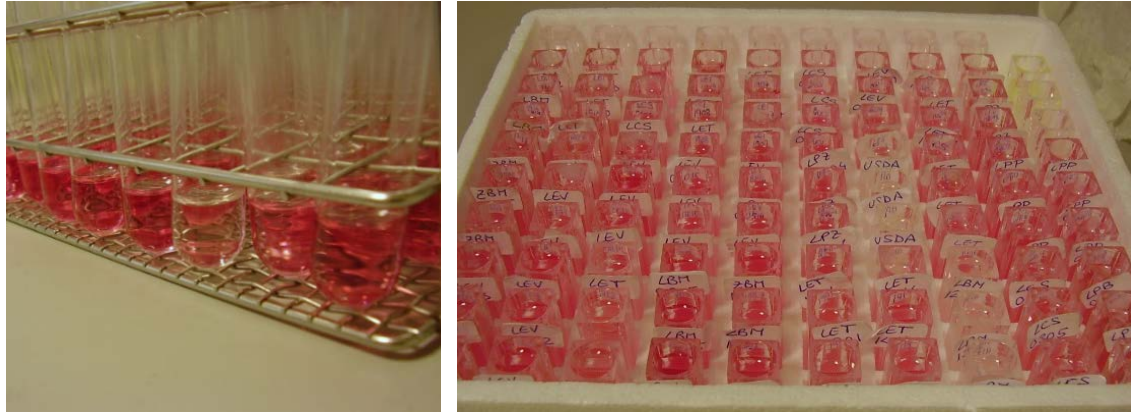


Figura 40. Coloración obtenida en la producción de IAA por las distintas cepas debido al reactivo Salkowsky.

### 4.2.3 Producción de sideróforos.

Las cepas que en mayor o menor medida produjeron sideróforos (Figura 41) fueron A13; C4; C2 y C3.

Figura 41. Prueba de producción de sideróforos. Se observan dos bacterias (C4 y C2) que producen sideróforos y dieron positivo en la prueba; también se observa el rizobio central que dio negativo (D10).





#### 4.2.4 Actividad ACC desaminasa.

Los resultados de la prueba realizada evalúan la capacidad de las bacterias para sintetizar la enzima ACC desaminasa que hidroliza el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), precursor del etileno. Los resultados muestran que existe actividad ACC desaminasa debido a que el crecimiento microbiano es mayor en algunas bacterias cuando se les adiciona ACC como fuente de N (Tabla 47). Si han crecido en el medio sin ninguna fuente de N, como ocurre en algunos casos, serían capaces de fijar N atmosférico en vida libre.

Se realizó una estimación de la capacidad de utilizar ACC como fuente de N para cada cepa, restando la OD (Densidad Óptica) a 600 nm en el medio que contiene ACC y en el control sin N, encontrando varias cepas en las que este valor es superior a 0. En la Tabla 47 están ordenadas de mayor a menor según este criterio, seleccionando para posteriores ensayos las tres que presentaron valores más elevados.

**Tabla 47. Actividad ACC desaminasa. Valores medios de crecimiento bacteriano en los medios indicados. Los valores son medias de tres determinaciones por cepa. C. : Control.**

Bacteria	OD 600 nm C. Sin N	OD 600 nm ACC	OD 600 nm ACC-C. sin N	Bacteria	OD 600 nm C. sin N	OD 600 nm ACC	OD 600 nm ACC-C. sin N
A7	0,020	0,053	0,033	LEV0603	0,035	0,030	0,000
LPA1413	0,036	0,051	0,015	LPP0913	0,022	0,018	0,000
ZBM1007	0,025	0,039	0,014	LET1903	0,052	0,047	0,000
C14	0,025	0,032	0,008	LEV0602	0,064	0,058	0,000
B5	0,030	0,037	0,007	A5	0,033	0,027	0,000
LPP0708	0,029	0,035	0,006	A6	0,026	0,019	0,000
LPP0913	0,054	0,060	0,006	LEV0607	0,034	0,027	0,000
C7	0,026	0,031	0,004	LPA1410	0,023	0,016	0,000
D10	0,017	0,021	0,004	LPA1417	0,015	0,008	0,000
E3	0,019	0,023	0,004	B4	0,031	0,023	0,000
C10	0,022	0,025	0,003	LPZ0708	0,034	0,026	0,000
LBM1209	0,008	0,010	0,002	LET1901	0,017	0,008	0,000
D6	0,015	0,017	0,002	C13	0,020	0,011	0,000
LCS0408	0,002	0,004	0,002	ZBM1005	0,095	0,084	0,000
LBM0201	0,019	0,021	0,001	C15	0,025	0,015	0,000
D8	0,032	0,033	0,001	C16	0,027	0,017	0,000
C4	0,094	0,094	0,000	LET1908	0,092	0,081	0,000
LBM0212	0,046	0,045	0,000	LEV0609	0,029	0,017	0,000
LBM1113	0,024	0,024	0,000	D5	0,045	0,032	0,000
D3	0,014	0,013	0,000	LCS0303	0,042	0,028	0,000
D7	0,014	0,013	0,000	A12	0,100	0,083	0,000
LCS0305	0,015	0,013	0,000	LET1912	0,035	0,017	0,000
D4	0,011	0,010	0,000	LET1907	0,102	0,070	0,000
B2	0,027	0,025	0,000	LBM0205	0,089	0,041	0,000
C6	0,027	0,024	0,000				

#### 4.2.5 Resumen de pruebas PGP

Los resultados obtenidos en la estudio de los diferentes efectos promotores del crecimiento a las cepas de *Rhizobium* seleccionadas de manera individual, se muestran en la tabla 48.

Tabla 48. Resultados de las distintas pruebas PGPR realizadas.

Cepa bacteriana	Solubilización de fosfato	IAA $\mu\text{g}$ de IAA / $10^8$ UFC	Producción de sideróforos	ACC, DO 600 nm ACC- Control sin N
C4	-	11,6	+	0,000
LET 1907	-	11,4	+	0,000
D7	-	11,2	-	0,000
LET 1908	-	9,0	-	0,000
C9	-	7,7	-	0,000
LBM 0212	-	7,4	-	0,000
A4	-	7,3	-	0,000
D1	-	7,2	-	0,000
D9	-	6,8	-	0,002
A11	-	6,7	-	0,015
A7	-	6,4	-	0,033
A2	-	6,4	-	0,000
C12	-	6,0	-	0,000
A8	-	5,4	-	0,000
E1	-	4,9	-	0,000
E2	-	4,7	-	0,014
C2	-	4,4	+	0,000
D10	-	4,1	-	0,004
B5	-	4,0	-	0,007
C14	-	3,8	-	0,008
C10	-	3,8	-	0,003
C6	-	3,7	-	0,000
D5	-	3,6	-	0,000
A5	-	3,6	-	0,000
E3	-	3,5	-	0,000
D3	-	3,5	-	0,000
D6	-	3,5	-	0,002
B2	-	3,5	-	0,000
D8	-	3,3	-	0,001
A6	-	3,3	-	0,000
C7	-	3,1	-	0,004
C16	-	3,0	-	0,000
C13	-	2,9	-	0,000
A12	-	2,8	-	0,000
C15	-	2,7	-	0,000
D4	-	2,7	-	0,000
LET 1901	-	2,7	-	0,000
LEV 0602	-	2,5	-	0,000
LPA 1417	-	2,5	+	0,000
LEV 0607	-	2,1	-	0,000
LCS 0305	-	2,0	-	0,000
LET 1912	-	2,0	-	0,000
LBM 1209	+	1,9	-	0,002
LPA 1410	-	1,8	-	0,000
LBM 1113	-	1,8	-	0,000
LBM 0201	-	1,7	-	0,001
B4	+	1,0	-	0,000

### **4.3 Efecto en planta en microcosmos de los rizobios seleccionados. Determinación de la dosis óptima.**

En este ensayo se evaluaron *in vivo* sobre plantas de cebada las bacterias seleccionadas por un mayor efecto PGP *In vitro* (Tabla 22), optimizando al mismo tiempo la dosis de las bacterias, aplicando el microorganismo de manera directa (sin usar abono) individualmente y en combinaciones binarias, trabajando en suelo no estéril (microcosmos).

En este ensayo se pretende obtener información sobre qué bacterias producen un mayor efecto PGPR, a qué dosis y su efecto en combinaciones o de manera individual para obtener el mayor beneficio en plantas de cebada.

Los resultados se dividen en un primer muestreo intermedio en el cual se analizó una maceta con 5 plantas y un muestreo final, con las 4 macetas (20 plantas) restantes de cada repetición que fueron analizadas al finalizar el ensayo.

#### **4.3.1 Parámetros de crecimiento al final del ahijado**

En este muestreo se analizó la producción de biomasa aérea de una maceta por unidad experimental antes del inicio del espigado, estudiando también el contenido de los principales nutrientes minerales: N, P, K, Ca y Mg.

El ANOVA respecto de la variable independiente “cepa inoculada” (Tabla 49) señala que no existen diferencias significativas entre las cepas, para los parámetros de crecimiento analizados, ni para el contenido de nutrientes.

En cuanto a los parámetros de crecimiento (Tabla 50) existen variaciones del 25 % en peso fresco, del 34 % en el peso seco y del 12 % en altura de la planta, aunque debido a las elevadas desviaciones estándar, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Los tratamientos microbianos muestran mejoría en los parámetros vegetativos estudiados en todos los casos excepto en el peso fresco la C4 (cepa más productora de IAA, y sideróforos) (Tabla 50). La cepa B4 (solubilizadora de fosfato) y D7 (productora de IAA) individualmente presentan buenos resultados; sin embargo, existe otra cepa, la A7 seleccionada por su actividad ACC desaminasa que las supera en varios parámetros, como la altura máxima, y el peso fresco y seco.

## Resultados

**Tabla 49. ANOVA respecto de la variable independiente "cepa inoculada", correspondiente al muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos (g.l: grados de libertad, mc: media cuadrática, F: estadístico F).**

	g.l.	Cepa	Dosis	Cepa x Dosis
		6	4	15
Altura Máxima (cm)	mc	35,088	67,091	18,392
	F	1,187	2,405	0,598
Nº Plantas	mc	0,556	0,806	6,044
	F	0,810	1,205	0,829
Peso seco/planta (g)	mc	0,400	0,429	0,544
	F	0,528	0,576	0,643
Peso fresco/planta (g)	mc	8,235	2,602	6,094
	F	1,189	0,357	0,822
N por planta (mg)	mc	191,917	384,114	314,929
	F	0,423	0,882	0,622
P por planta (mg)	mc	4,303	5,813	11,002
	F	0,296	0,411	0,683
K por planta (mg)	mc	146,06	257,509	289,365
	F	0,326	0,594	0,567
Ca por planta (mg)	mc	2,340	4,405	4,672
	F	0,309	0,603	0,542
Mg por planta (mg)	mc	1,019	1,217	1,878
	F	0,335	0,409	0,536
N (% en la biomasa)	mc	0,077	0,094	0,114
	F	0,640	0,793	0,906
P mg/kg de biomasa	mc	10712	685421,639	294051,574
	F	0,344	2,515	1,011
K mg/kg de biomasa	mc	2683232,069	5604242,875	12971533,014
	F	0,225	0,488	1,093
Ca mg/kg de biomasa	mc	80901,119	222889,803	123495,915
	F	0,324	0,941	1,093
Mg mg/kg de biomasa	mc	36719,097	110795,431	19999,766
	F	0,455	1,473	0,205

**Tabla 50. Valores medios por planta de diferentes parámetros de crecimiento en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente "cepa inoculada". Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de peso seco.**

Cepa inoculada	Peso seco / planta (g)	Peso fresco / planta (g)	Altura Máxima (cm)	Nº de plantas
Control	1,44	7,92	46,1	4,0
C4	1,70	7,39	48,7	4,7
C4 + A7	1,84	9,94	52,6	4,1
C4 + B4	1,92	8,47	51,0	4,5
B4	1,94	8,72	50,7	4,4
D7	2,01	8,4	50,8	4,6
A7	2,20	9,46	52,9	4,3

Las combinaciones de cepas también superan al control, aunque han presentado un menor efecto en los parámetros analizados que las cepas aisladas B4, D7 y A7.

Todos los cultivos puros de las cepas de rizobios seleccionadas y las combinaciones de los mismos mejoran el establecimiento de las plantas, ya que en todos los casos el número de plantas supera a las del control.

En cuanto a la concentración de los nutrientes en la biomasa aérea, todos los tratamientos con bacterias presentaron mayor contenido en N que el control, y menor contenido de P, Ca y Mg, no teniendo el K una tendencia clara. Las diferencias llegaron a ser de un 20 % para el N, 13 % el P, 6 % el K, 12 % el Ca y 16 % para el Mg (Tabla 51).

**Tabla 51 . Valores de la concentración de nutrientes en la biomasa aérea en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente "cepa inoculada". Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de concentración de nitrógeno en la biomasa aérea.**

<b>Cepa inoculada</b>	<b>N</b> (% en la biomasa)	<b>P</b> (mg/kg)	<b>K</b> (mg/kg)	<b>Ca</b> (mg/kg)	<b>Mg</b> (mg/kg)
Control	1,79	4208	20918	2948	1911
A7	1,96	3804	20298	2660	1669
B4	1,98	3732	20835	2692	1642
C4 + A7	2,00	3741	21013	2716	1699
D7	2,05	3798	21461	2774	1733
C4 + B4	2,10	3775	20206	2622	1679
C4	2,14	3857	21321	2824	1736

**Tabla 52. Valores medios del contenido total de diferentes nutrientes en la biomasa aérea por planta en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente "cepa inoculada". Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de nitrógeno total por planta.**

<b>Cepa inoculada</b>	<b>N / planta</b> (mg)	<b>P / planta</b> (mg)	<b>K / planta</b> (mg)	<b>Ca / planta</b> (mg)	<b>Mg / planta</b> (mg)
Control	25,01	5,92	29,71	4,14	2,61
C4 + A7	35,91	6,79	38,17	4,83	2,98
B4	38,63	7,26	41,27	5,27	3,19
C4 + B4	40,25	7,16	38,06	5,00	3,19
D7	41,47	7,59	43,27	5,37	3,47
C4	42,11	7,64	42,22	5,57	3,42
A7	43,86	8,43	45,22	5,97	3,77

El contenido total por planta de estos elementos en la biomasa aérea presentó diferencias de todos los tratamientos respecto del control superiores al 43 % para el N, 14 % en el P, 28 % en el potasio y 14 % en el Ca y Mg, siendo el control el tratamiento que presentó los menores valores en todos los nutrientes (Tabla 52).

A pesar de la falta de significación, estas diferencias merecen un comentario por la magnitud de las mismas y su consistencia. La asimilación de nitrógeno queda mejorada por los microorganismos con respecto al testigo. La cepa C4 incrementa en un 15 % la concentración de N presente en la biomasa, con respecto al control sin microorganismos. Esto supone que a pesar de que las plantas tratadas con dicha cepa no presentan una producción de biomasa claramente superior a la del control, el contenido de nitrógeno total por planta es de los más altos, superando en un 68 % al del testigo.

Se observa que, cuando se inocula con la cepa solubilizadora de fosfato B4, la concentración de fósforo en la biomasa aérea es la más baja de todos los tratamientos, incluso inferior que en el testigo, aunque el contenido total de fósforo en la planta es superior al del testigo en un 23 %.

## Resultados

Tampoco existen diferencias significativas respecto de la variable independiente dosis de microorganismos (ANOVA en Tabla 49).

**Tabla 53. Valores medios de diferentes parámetros de crecimiento en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de peso fresco.**

Dosis (UFC / maceta)	Dosis (UFC / g de suelo)	Peso fresco / planta (g)	Peso seco / planta (g)	Altura (cm)	Nº de plantas
Control	Control	7,924	1,44	46,100	4,00
$1,3 \times 10^4$	26	8,242	1,74	50,794	4,72
$5 \times 10^5$	$10^3$	9,207	1,94	53,278	4,28
$5 \times 10^7$	$10^5$	8,668	2,00	48,678	4,22
$5 \times 10^6$	$10^4$	8,802	2,06	51,583	4,44

En cuanto a los parámetros indicadores del crecimiento, los valores numéricos indican superioridad de cualquier concentración frente al control sin inocular (Tabla 53). Por otra parte las concentraciones intermedias son las que proporcionan, en general, valores más elevados para todos los parámetros, siendo la dosis de  $10^4$  UFC / g de suelo ( $5 \times 10^6$  UFC / maceta) la que presentó mayor peso seco.

Respecto al contenido de nutrientes, se vuelve a confirmar que la asimilación de nitrógeno estimada por la concentración de N en la biomasa aérea (Tabla 54) – se mejora con los tratamientos, lo que queda reflejado en el contenido total de N por planta (Tabla 55). De nuevo las dosis intermedias son los que mejores resultados presentan.

En el potasio las diferencias son prácticamente inexistentes. Para los demás nutrientes, la concentración es superior en el control que en cualquiera de las dosis del tratamiento (Tabla 54), aunque debido a la estimulación del crecimiento vegetal con los tratamientos, el contenido total por planta en el testigo sin inocular alcanza el valor más bajo en todos los nutrientes (Tabla 55).

**Tabla 54. Valores de la concentración de nutrientes en la biomasa aérea en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las dosis están ordenadas por valores crecientes de concentración de nitrógeno en la biomasa aérea.**

Dosis (UFC/maceta)	Dosis (UFC/g de suelo)	N (% en la biomasa)	P mg/kg	K mg/kg	Ca mg/kg	Mg mg/kg
Control	Control	1,79	4208	20918	2948	1911
$5 \times 10^5$	$10^3$	1,97	3520	20938	2562	1581
$5 \times 10^7$	$10^5$	2,04	3732	19947	2696	1717
$1,3 \times 10^4$	26	2,04	3955	21081	2766	1745
$5 \times 10^6$	$10^4$	2,11	3932	21457	2835	1729

**Tabla 55. Valores medios del contenido total de diferentes nutrientes en la biomasa aérea por planta en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de la variable independiente "dosis de microorganismos". Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de nitrógeno total por planta.**

Dosis (UFC/maceta)	Dosis (UFC/g de suelo)	N / planta (mg)	P / planta (mg)	K / planta (mg)	Ca / planta (mg)	Mg / planta (mg)
Control	Control	25,01	5,92	29,71	4,14	2,61
$1,3 \times 10^4$	26	35,24	6,87	36,77	4,79	3,03
$5 \times 10^7$	$10^5$	40,39	7,45	40,78	5,21	3,36
$5 \times 10^5$	$10^3$	40,90	7,39	43,48	5,32	3,32
$5 \times 10^6$	$10^4$	44,95	8,20	44,45	6,00	3,64

Los resultados del ANOVA conjunto para las dos variables independientes (cepa inoculada y dosis de microorganismos) se presentan en la Tabla 49.

En primer lugar, se observa que no existen interacciones significativas entre la cepa utilizada y la dosis. En segundo lugar, se vuelve a confirmar la superioridad de la mayoría de los tratamientos con respecto al control, en el caso de producción de biomasa vegetal evaluada mediante el peso seco / planta (Tabla 56).

Las dosis que mejores resultados presentaron fueron las concentraciones intermedias  $10^3$  y  $10^4$  UFC / g suelo. La concentración 26 UFC / g suelo presentó los valores más bajos excepto para la cepa A7 y la concentración  $10^5$  UFC / g suelo se situó en la parte media de la tabla 54.

Resulta importante que, para el establecimiento de las plantas, la concentración que mejor ha funcionado ha sido la menor de las cuatro probadas (26 UFC / g suelo), lo cual puede indicar que no es necesario concentraciones muy altas en los estadíos iniciales de desarrollo vegetal; sin embargo sí es necesario incrementar la dosis en fases posteriores de desarrollo vegetal.

Cabe destacar que, en general, las cepas individuales se comportaron mejor que las combinadas, no observándose ningún efecto sinérgico en la combinación de las cepas. Así la combinación que mejores resultados presentó fue la cepa C4 junto con la B4, aunque no llegó a superar en el contenido de nutrientes a las mismas cepas utilizadas de manera individual.

Tabla 56. Valores medios de diferentes parámetros de crecimiento y del contenido total de diferentes nutrientes en la biomasa aérea por planta, en el muestreo intermedio en fase vegetativa del ensayo de microcosmos, respecto de las variables independientes “cepa inoculada” y “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de peso fresco.

Tratamiento	Dosis		Peso seco / planta (g)	Peso fresco / planta (g)	Nº de plantas	Altura Máxima (cm)	N / planta (mg)	P / planta (mg)	K / planta (mg)	Ca / planta (mg)	Mg / planta (mg)
	(UFC/maceta)	(UFC/g suelo)									
C4	$1,3 \times 10^4$	26	1,33	7,69	5	51,3	29,53	5,23	27,99	4,21	2,42
C4 + B4	$1,3 \times 10^4$	26	1,33	7,65	5	52,4	28,22	5,49	30,09	3,58	2,32
D7	$1,3 \times 10^4$	26	1,37	7,25	5	48,4	27,31	5,31	29,1	3,6	2,28
B4	$5 \times 10^6$	$10^4$	1,41	7,5	5	47,6	26,42	4,91	28,24	3,75	2,41
Control	-	-	1,44	7,92	4	46,1	25,01	5,92	29,71	4,14	2,61
C4 + A7	$1,3 \times 10^4$	26	1,5	7,98	4,67	50,7	26,83	5,22	30,37	3,82	2,44
A7	$5 \times 10^7$	$10^5$	1,72	8,73	3,67	50	37,71	6,77	35,29	4,84	2,93
C4 + A7	$5 \times 10^6$	$10^4$	1,72	9,62	4,33	53,3	34,42	6,32	36,64	4,66	2,93
C4 + B4	$5 \times 10^7$	$10^5$	1,77	9,56	4	48,6	34,93	6,5	34,56	4,4	2,86
D7	$5 \times 10^5$	$10^3$	1,89	6,78	5	49,7	41,28	7,07	43,56	5	3,32
C4	$5 \times 10^7$	$10^5$	1,96	7,52	4,67	43,3	38,95	7,47	44,65	5,2	3,64
B4	$5 \times 10^5$	$10^3$	1,98	10,87	3,67	56,4	41,34	7,79	49,49	5,46	3,17
C4 + A7	$5 \times 10^7$	$10^5$	2,05	10,38	4	50,2	41,04	7,7	38,59	5,17	3,29
C4 + A7	$5 \times 10^5$	$10^3$	2,08	11,76	3,33	56	41,35	7,92	47,06	5,67	3,25
A7	$5 \times 10^5$	$10^3$	2,11	10,43	4,33	55,7	34,11	6,83	40,13	5,32	3,38
C4	$5 \times 10^6$	$10^4$	2,12	7,32	4,33	50,9	55,82	9,86	53,23	7,16	3,89
B4	$5 \times 10^7$	$10^5$	2,18	7,79	4,33	49,5	46,74	8,06	45,5	5,94	3,57
B4	$1,3 \times 10^4$	26	2,19	8,74	4,67	49,1	40,02	8,28	41,84	5,94	3,62
C4 + B4	$5 \times 10^5$	$10^3$	2,21	8,38	4,67	52,8	43,16	6,74	37,61	4,81	3,06
A7	$5 \times 10^6$	$10^4$	2,21	8,53	5	53	44,08	8,46	44,24	6,1	3,67
D7	$5 \times 10^7$	$10^5$	2,31	8,04	4,67	50,5	43	8,24	46,05	5,73	3,85
C4	$5 \times 10^5$	$10^3$	2,37	7,03	4,67	49,2	44,16	7,99	43,02	5,69	3,72
C4 + B4	$5 \times 10^6$	$10^4$	2,39	8,3	4,33	50,1	54,69	9,91	49,99	7,19	4,51
D7	$5 \times 10^6$	$10^4$	2,48	11,54	3,67	54,6	54,29	9,74	54,35	7,14	4,42
A7	$1,3 \times 10^4$	26	2,74	10,15	4	52,8	59,52	11,67	61,23	7,61	5,1



### 4.3.2 Parámetros de crecimiento y rendimiento al final del ciclo productivo

En este ensayo en suelo real en invernadero (Figura 42), se ha evaluado la influencia de los tratamientos mejorados con microorganismos sobre el potencial productivo de las plantas de cebada de una manera introductoria, pues estos datos se complementan con los obtenidos posteriormente en los ensayos en campo.

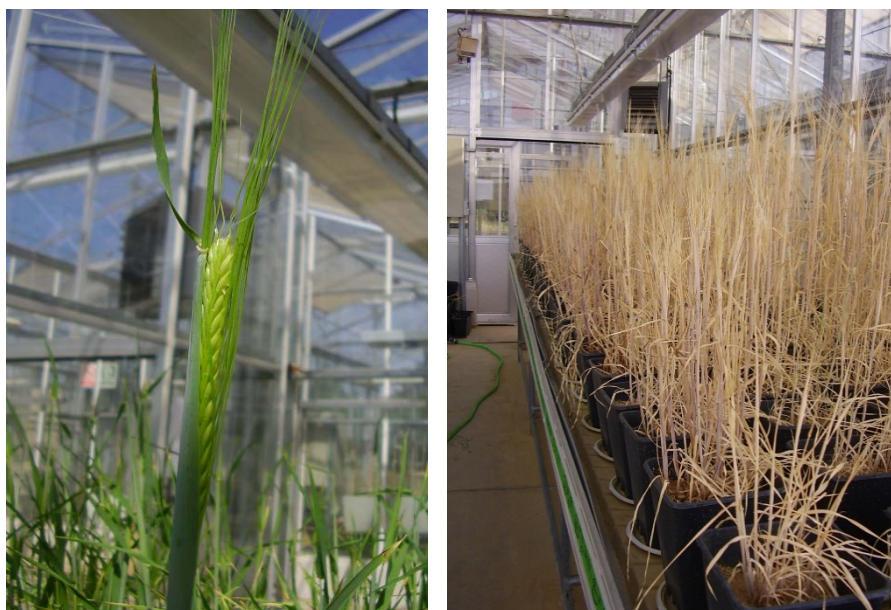


Figura 42. Final del ciclo de la cebada en el ensayo de microcosmos.

Para la variable independiente "cepa inoculada", el rendimiento muestra diferencias altamente significativas entre tratamientos, mientras que para la biomasa total y el número de espigas, no existen diferencias significativas (Tabla 57).

**Tabla 57. ANOVA respecto de la variable independiente "cepa inoculada", correspondiente al muestreo final en el momento de la cosecha para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones.**

<b>Variabes dependientes</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Rendimiento por unidad experimental <sup>1</sup> (g)	6	68,611	4,347	0,001
Rto. seco 72 h 70 °C por unidad experimental <sup>1</sup> (g)	6	60,625	4,347	0,001
Biomasa total por unidad experimental <sup>1</sup> (g)	6	10,503	0,109	0,995
Nº espigas por unidad experimental <sup>1</sup>	6	15,174	0,497	0,809

<sup>1</sup>Hace referencia a la unidad experimental constituida por 4 macetas. En cada maceta inicialmente se sembraron 5 semillas

Tres de los tratamientos presentaron un rendimiento significativamente mayor que el testigo, concretamente A7, C4 y D7 (Tabla 58). Aunque los demás tratamientos también presentaron producciones medias de grano muy superiores a las del control, si bien por la elevada variabilidad de los resultados, las diferencias no han llegado a ser significativas. Cabe destacar

## Resultados

que el tratamiento con mayor rendimiento, fue el que menor número de espigas presenta, por lo que las espigas estuvieron mejor formadas, y el grano alcanzó mayor peso específico.

En cuanto a la biomasa total no existieron diferencias significativas, si bien los valores obtenidos por las cepas fueron todos superiores al control. En valores numéricos dichas diferencias fueron en torno al 6 % en los casos extremos. El tratamiento B4 fue el que mayor biomasa total ha producido y el que menor rendimiento en grano ha presentado, aunque fue superior al del testigo (Tabla 58).

**Tabla 58. Valores medios de diferentes parámetros en el ensayo de microcosmos, correspondientes al muestreo final en el momento de la cosecha, respecto de la variable independiente “cepa inoculada”. Los valores seguidos de la misma no difieren significativamente (prueba LSD  $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de rendimiento.**

Cepa inoculada	Biomasa total <sup>1</sup> (g)	Rendimiento <sup>1</sup> (g)	Rto. Seco 72 h 70 °C <sup>1</sup> (g)	Nº espigas <sup>1</sup>
Control	60,60 a	0,40 a	0,38 a	47,00 a
C4 + B4	62,02 a	3,26 abc	3,06 abc	47,00 a
C4	62,51 a	6,28 d	5,91 d	48,83 a
D7	62,61 a	9,23 cd	8,67 cd	45,42 a
A7	62,84 a	5,58 bc	5,24 bc	48,00 a
C4 + A7	63,93 a	4,05 abc	3,81 abc	48,25 a
B4	64,26 a	2,71 ab	2,55 ab	46,83 a

<sup>1</sup>Hace referencia a la unidad experimental constituida por 4 macetas. En cada maceta inicialmente se sembraron 5 semillas

Respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos” no existen diferencias significativas para ninguna de las variables dependientes (Tabla 59).

**Tabla 59. ANOVA respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”, correspondiente al muestreo final en el momento de la cosecha para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones.**

Variables dependientes	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Rendimiento por unidad experimental <sup>1</sup> (g)	4	17,972	0,890	0,474
Rto. seco 72 h 70 °C por unidad experimental <sup>1</sup> (g)	4	15,880	0,890	0,474
Biomasa total por unidad experimental <sup>1</sup> (g)	4	85,036	0,951	0,440
Nº espigas por unidad experimental <sup>1</sup>	4	10,303	0,339	0,851

<sup>1</sup>Hace referencia a la unidad experimental constituida por 4 macetas. En cada maceta se sembraron 5 semillas.

**Tabla 60. Valores medios de diferentes parámetros en el ensayo de microcosmos, correspondientes al muestreo final en el momento de la cosecha, respecto de la variable independiente “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Las cepas están ordenadas por valores crecientes de rendimiento.**

Dosis		Biomasa total <sup>1</sup> (g)	Rendimiento <sup>1</sup> (g)	Rto. seco <sup>1</sup> 72 h 70 °C (g)	Nº espigas <sup>1</sup>
(UFC/maceta)	(UFC/g suelo)				
1,3 10 <sup>4</sup>	26	60,53	5,68	5,34	47,72
Control	Control	60,6	0,40	0,38	47,00
5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	61,53	5,07	4,77	46,11
5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	64,16	5,03	4,73	47,67
5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	65,89	4,96	4,66	48,06

<sup>1</sup>Hace referencia a la unidad experimental constituida por 4 macetas. En cada maceta se sembraron 5 semillas.

Los rendimientos obtenidos muestran que la concentración que mejores resultados ha presentado ha sido  $1,3 \times 10^4$  UFC / maceta o 26 UFC / g de suelo, por lo que los rendimientos no mejoran con grandes dosis de microorganismos. Sin embargo, este tratamiento es la cepa que produjo menos biomasa total (Tabla 60).

Según puede deducirse del ANOVA conjunto para las dos variables independientes (cepa inoculada y dosis del microorganismo) (Tabla 61), no existen interacciones significativas entre ambas.

**Tabla 61. ANOVA combinado de las dos variables independientes “cepa inoculada” y “dosis de microorganismos” correspondiente al muestreo final en el momento de la cosecha, para evaluar el efecto de diferentes cepas a diferentes concentraciones.**

Variables dependientes	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Rendimiento <sup>1</sup> (g)	15	9,951	0,542	0,903
Rto. seco 72 h 70 °C <sup>1</sup> (g)	15	8,793	0,542	0,903
Biomasa total <sup>1</sup> (g)	15	32,421	0,283	0,995
Nº espigas <sup>1</sup>	15	13,537	0,369	0,981

<sup>1</sup>Se refiere por unidad experimental constituida por 4 macetas. En cada maceta se sembraron 5 semillas

La Tabla 62 presenta los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos de manera individualizada, es decir, para cada cepa y cada dosis. De la observación de esta tabla, que confirma una vez más la efectividad de los tratamientos respecto al control, puede deducirse que la cepa que presentó un mayor rendimiento fue la D7 y la que presentó la mayor producción de biomasa fue la B4. En cuanto a las concentraciones de microorganismos la dosis 26 UFC / g de suelo ( $1,3 \times 10^4$  UFC / maceta) presentó los valores más altos de rendimiento y en cuanto a la producción de biomasa fue la dosis  $10^3$  UFC / g suelo ( $5 \times 10^5$  UFC / maceta) la que mejores resultados ha presentado. También se puede observar que la combinación de rizobios no mejoró a los tratamientos con microorganismos de manera individual.

Se realizó un análisis de suelo tras la cosecha de las macetas del testigo y de dos tratamientos, uno la cepa solubilizadora de fosfato B4 y otro una cepa no solubilizadora la A7, a la máxima concentración ( $10^5$  UFC/g de suelo o  $5 \times 10^7$  UFC/maceta) (Tabla 63). El parámetro con mayores diferencias entre tratamientos es el contenido de fósforo. Respecto al control, tanto la cepa B4 como la A7, muestran contenidos residuales más elevados de fósforo fácilmente asimilable (Olsen *et al.* 1954).

## Resultados

**Tabla 62. Valores medios de diferentes parámetros en el ensayo de microcosmos, correspondientes al muestreo final en el momento de la cosecha, respecto de las variables independientes “cepa inoculada” y “dosis de microorganismos”. Los valores no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).**

Ordenado en función de:		El rendimiento por bloque <sup>1</sup>			La biomasa total por bloque				
Tratamiento	Dosis		Rto (g)	Rto. Seco (g)	Biomasa total (g)	Tratamiento	Dosis		Biomasa total (g)
	UFC / maceta	UFC / g suelo					UFC / maceta	UFC / g suelo	
TESTIGO	-	-	0,40	0,38	60,60	C4	1,3 10 <sup>4</sup>	26	53,47
B4	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	1,23	1,16	61,13	A7	1,3 10 <sup>4</sup>	26	57,97
C4+A7	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	1,67	1,57	66,70	D7	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	58,97
C4+B4	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	2,03	1,91	60,47	A7	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	59,20
B4	1,3 10 <sup>4</sup>	26	2,40	2,26	65,00	C4+B4	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	60,47
C4+B4	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	2,40	2,26	62,83	TESTIGO	-	-	60,60
C4+B4	1,3 10 <sup>4</sup>	26	2,87	2,69	62,80	B4	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	61,13
B4	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	2,87	2,69	68,47	C4+A7	1,3 10 <sup>4</sup>	26	61,40
A7	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	3,97	3,73	59,20	C4+B4	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	61,97
C4+A7	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	4,03	3,79	62,57	B4	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	62,43
C4	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	4,07	3,82	68,17	D7	1,3 10 <sup>4</sup>	26	62,53
B4	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	4,33	4,07	62,43	C4+A7	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	62,57
C4+A7	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	4,60	4,32	65,07	C4+B4	1,3 10 <sup>4</sup>	26	62,80
A7	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	4,97	4,67	68,20	C4+B4	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	62,83
A7	1,3 10 <sup>4</sup>	26	5,00	4,70	57,97	D7	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	63,47
C4	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	5,67	5,33	63,90	C4	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	63,90
C4+B4	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	5,73	5,39	61,97	C4	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	64,50
C4+A7	1,3 10 <sup>4</sup>	26	5,90	5,55	61,40	B4	1,3 10 <sup>4</sup>	26	65,00
C4	1,3 10 <sup>4</sup>	26	7,50	7,05	53,47	C4+A7	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	65,07
D7	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	7,50	7,05	63,47	D7	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	65,47
C4	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	7,90	7,43	64,50	A7	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	66,00
D7	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	8,10	7,61	65,47	C4+A7	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	66,70
A7	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	8,37	7,86	66,00	C4	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	68,17
D7	1,3 10 <sup>4</sup>	26	10,40	9,78	62,53	A7	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	68,20
D7	5 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10,90	10,25	58,97	B4	5 10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	68,47

<sup>1</sup>Hace referencia a la unidad experimental constituida por 4 macetas. En cada maceta inicialmente se sembraron 5 semillas

**Tabla 63. Análisis de suelo tras la cosecha de la cebada en el ensayo de microcosmos.**

Parámetro analizado	Tratamiento		
	B4	Testigo	A7
pH	8,92	8,84	8,77
Materia orgánica (%)	1,58	1,73	1,71
Nitrógeno total (%)	0,14	0,14	0,14
Fósforo Olsen (mg/kg)	21,44	16,06	24,80
Calcio (cmol(+)/kg)	24,44	22,64	22,03
Potasio (cmol(+)/kg)	0,48	0,46	0,49
Magnesio (cmol(+)/kg)	3,16	2,91	2,98
Sodio (cmol(+)/kg)	5,46	4,25	5,49
C.I.C. (cmol(+)/kg) (Capacidad de Intercambio catiónico)	20,66	18,64	22,07
Conductividad (dS/m)	0,29	0,30	0,40

## 4.4 Nivel de interacción entre rizobios y raíz

En este ensayo se ha evaluado el grado de interacción entre la bacteria y la raíz de plantas de cebada y se visualizó dicha colonización en tiempo real. La cepa de *Rhizobium* utilizada se transformó con éxito y fue utilizada para la inoculación en cebada y su posterior observación al microscopio.

### 4.4.1 Observación al microscopio óptico

En la primera prueba se observó que existía una estrecha asociación entre las bacterias y la raíz. La inoculación se realizó a las 48 h de iniciada la germinación. La cantidad de bacterias utilizadas para la inoculación de las raíces resultó ser escasa; todo ello contribuyó a que fuese difícil localizar las bacterias marcadas al microscopio (Figura 43. A). Se utilizaron 250  $\mu\text{L}$  de cultivo puro en medio YMB a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC / mL para, lo que se demostró insuficiente para poder obtener conclusiones consistentes. Por lo tanto, en las siguientes pruebas se fue aumentando la cantidad de microorganismos que entraron en contacto con la raíz. Para ello se modificó el método de inoculación por la inmersión de las semillas en el caldo de cultivo de la bacteria.

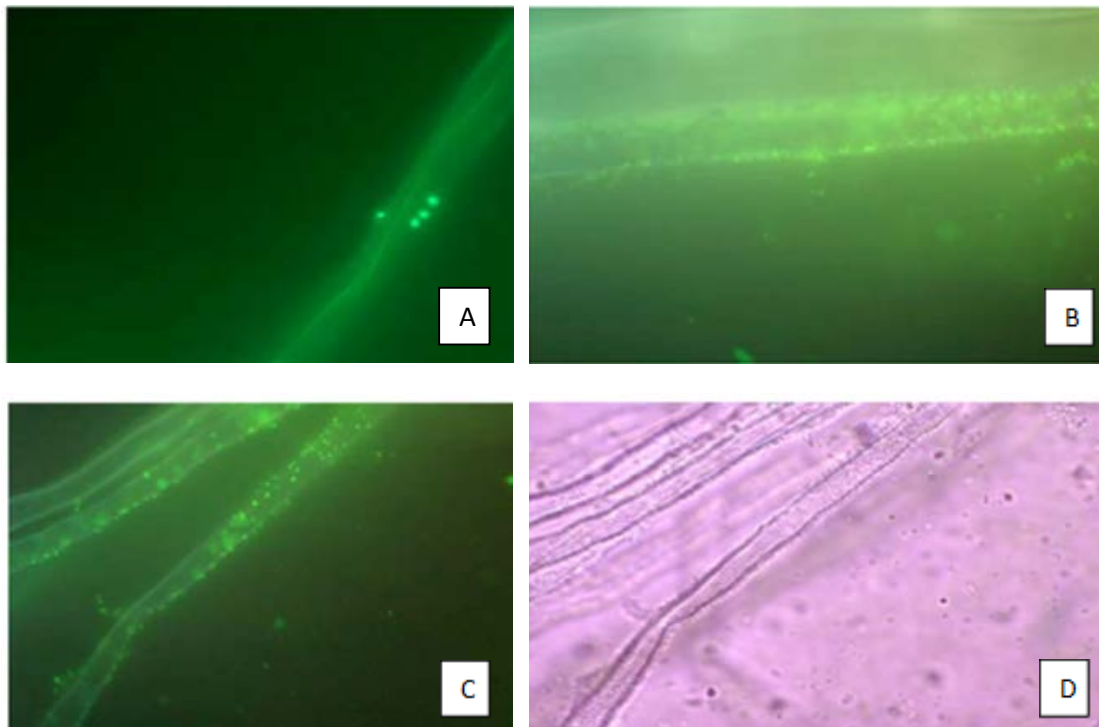


Figura 43. Observaciones con microscopía confocal de los resultados de las distintas pruebas, A) Primera prueba en la que las raíces de cada plántula fueron inoculadas con 250  $\mu\text{L}$  del cultivo puro de la bacteria. B) Observación de la segunda prueba, las raíces de cada plántula fueron sumergidas durante 30 minutos en el cultivo puro de la bacteria transformada. C) y D) Tercera prueba, en la que las raíces de cada plántula fueron sumergidas durante 3 horas en el cultivo puro de la bacteria transformada.

## Resultados

En la segunda prueba, se volvió a observar una asociación entre las bacterias y la raíz (Figura 43. B), mejorando la visualización de dicha asociación en el microscopio. Gracias al procedimiento utilizado de inmersión de las raíces en el caldo bacteriano, existía una mayor presencia de los microorganismos, y se evidenció que existe una asociación rizosférica entre bacteria y planta. Otra razón que puede justificar la mejor colonización observada es que la inoculación se realizó a los 4 días después de la siembra en placa, en vez de 2 días después como se hizo en la primera prueba. En consecuencia las raíces estaban más desarrolladas, y el contacto entre raíz y microorganismo inoculado tuvo lugar en una mayor superficie rizosférica. Aparentemente la bacteria permaneció en la rizosfera (Figura 43. B), pero para confirmarlo se procedió a analizar el interior de la raíz, para averiguar si los rizobios habían penetrado. Tras esterilizar superficialmente la raíz, ésta se machacó con agua destilada y se sembró el extracto resultante en medio YMA. No se observó crecimiento de microorganismos, por lo que este resultado parece indicar que la asociación es rizosférica y no endofítica.

Para confirmarlo se realizó una tercera prueba, en la que las condiciones de esterilización de la superficie de la raíz no fueron tan agresivas. Es posible que unas condiciones excesivamente severas en la esterilización de la raíz pudieran haber afectado a los microorganismos endofíticos si los hubiera. Por esta razón se realizó una nueva prueba para descartar que los resultados negativos de presencia de bacterias en el interior de la raíz, pudieran deberse al proceso de esterilización. Las observaciones microscópicas correspondientes a la tercera prueba se presentan en la Figura 43 (C y D). En esta tercera prueba se sumergieron las plántulas germinadas en el caldo de cultivo de la bacteria durante 3 horas en lugar de 30 minutos, lo que no supuso diferencia en la colonización endofítica del rizobio. De igual forma, la otra modificación realizada respecto de la segunda prueba, que consistió en empapar con el caldo inoculante el filtro Whatman en el que crecieron las plántulas, en vez de empaparlo con medio de cultivo estéril YMB, pero no afectó a la colonización del interior del rizobio. Sin embargo, la observación microscópica mejoró en la tercera prueba respecto a la segunda (Figura 43. B), pudiendo observar los microorganismos en las raíces de cebada. Aún así, de manera visual no se pudo concluir si el nivel de colonización de los microorganismos es rizosférico o endofítico, para lo cual se realizó la siguiente prueba de aislamiento.

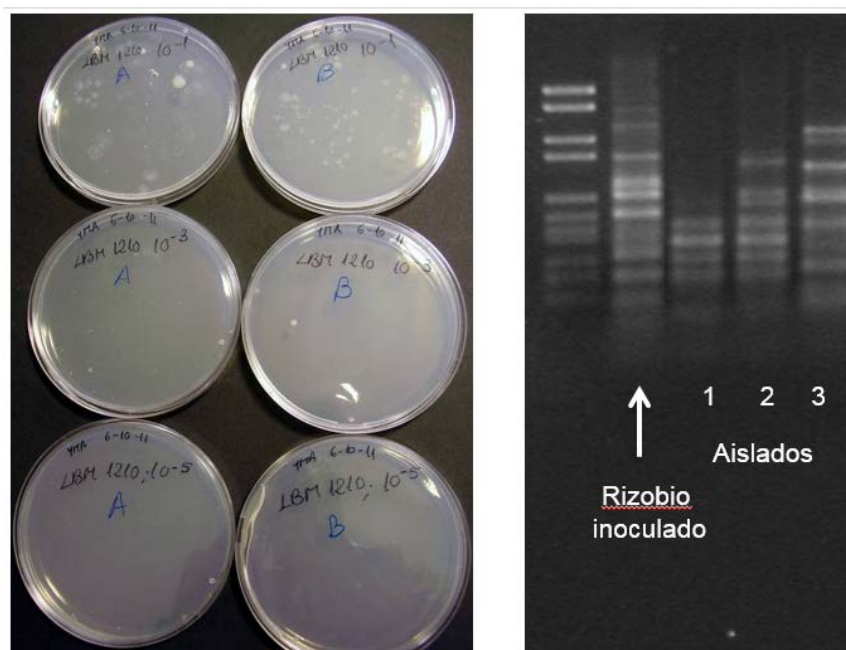
### **4.4.2 Aislamiento e identificación de endófitos**

El cultivo en YMA del contenido interior de la raíz, mostró el crecimiento de algunos microorganismos (Figura 44. A). Dichos microorganismos deben proceder del interior de la raíz, ya que ésta había sido sometida a una esterilización superficial. El testigo consistió en la

colocación de raíces esterilizadas superficialmente e intactas sobre una placa de YMA, en ningún caso se observó crecimiento de microorganismos en el exterior de la raíz.

En el siguiente paso, se comprobó si los microorganismos aislados correspondían a los rizobios inoculados o se trataba de otros microorganismos endofíticos procedentes del interior de la semilla, que sería la única fuente posible, ya que se trabajó en condiciones gnotobióticas. Las semillas se esterilizaron, pero sólo externamente pues no es posible una esterilización de los tejidos internos sin destruir el embrión.

Con objeto de averiguar si los microorganismos aislados se correspondían con el rizobio inoculado, se comparó el perfil RAPD (cebador M13) de las colonias intrarradiculares con aspecto morfológico externo similar al del rizobio inoculado, con dicho rizobio. Para ello se analizó el patrón de bandas obtenido en dicho perfil y no se observó coincidencia (Figura 44. B). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que la asociación entre el rizobio y las raíces del cereal se produce a nivel rizosférico.



**Figura 44. A) Colonias formadas por microorganismos endofíticos de raíces de cebada obtenidas en condiciones de esterilidad, que habían sido inoculadas por inmersión durante 3 horas en el cultivo puro del rizobio transformado (tercera prueba). Las raíces antes del recuento fueron esterilizadas superficialmente en etanol al 70% durante 1 minuto seguido de 5 minutos en NaClO al 5%. B) Patrón de bandas con el RAPD M13 correspondiente al rizobio inoculado y a los 3 aislados del interior de la raíz con morfología de la colonia más similar a la del género *Rhizobium*.**

En cuanto a la segunda prueba, no se aisló ningún endófito de la raíz, se supone que fue debido a una esterilización muy agresiva ya que en la tercera prueba realizada sí se aislaron bacterias del interior de la raíz, diferentes del rizobio inoculado, procedentes por lo tanto del interior de la semilla.



#### 4.5 Evaluación en campo de los fertilizantes mejorados con rizobios en cultivos de trigo y cebada

En los ensayos de campo se evaluaron cuatro genotipos diferentes, tres variedades de trigo, *Core* en Berengenilla (Figura 45. A), *Avispa* en Rancho Paulo (Figura 45. B) (Carmona, Sevilla), trigo *Arthur Nick* en Algarabejo (Sevilla) (Figura 45. D) y una variedad de cebada *Publican* en Beja (Portugal) (Figura 45. C).

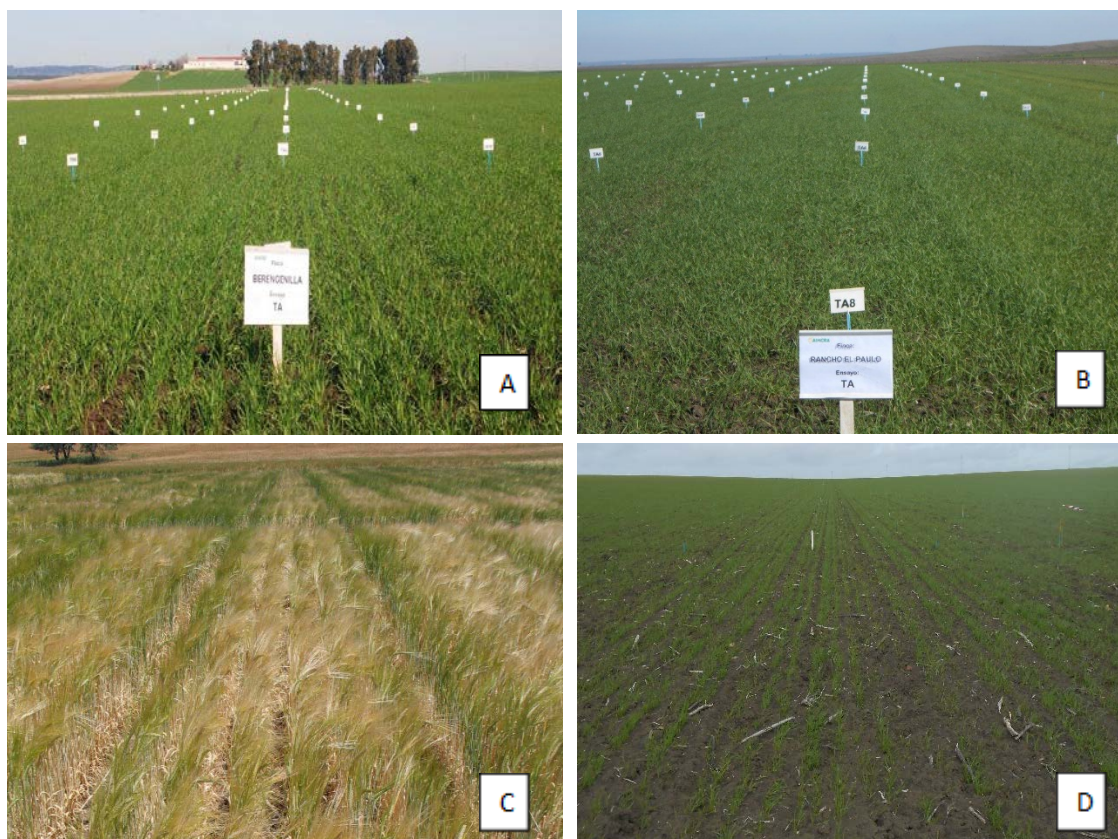


Figura 45. Ensayos de trigo en Berengenilla (A) y Rancho Paulo (B), ensayo de cebada en Beja (C) y de trigo en Algarabejo (D).

En primer lugar se realizó un análisis del efecto del genotipo en la eficiencia de los tratamientos fertilizantes (Tabla 64), de donde se deduce que existen diferencias significativas entre genotipos y tratamientos para varios de los parámetros medidos. Se observan interacciones en la humedad y el índice de cosecha.

Para cada variedad se ha realizado un estudio del efecto de los tratamientos de manera independiente.



Tabla 64 ANOVA conjunto de todos los parámetros analizados, para las fuentes de variación genotipo, tratamiento e interacción entre ambos (valor de significación \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

	g.l.	Genotipo	Tratamiento	Tratamiento x genotipo
		3	8	24
<b>Rendimiento Kg/ha</b>	mc	45316503,941***	1095134,053***	125395,322
	F	388,608	9,391	1,074
<b>Peso específico Kg/hl</b>	mc	571,051***	3,640	5,837
	F	110,303	0,701	1,125
<b>Humedad</b>	mc	228,190***	2,308***	1,006***
	F	569,454	5,758	2,510
<b>Peso seco grano Kg/ha</b>	mc	37486846,310***	924299,696***	99980,478
	F	419,656	10,347	1,119
<b>Peso seco paja Kg/ha</b>	mc	1274476193,749***	2127838,994**	328330,525
	F	180,283	3,009	0,464
<b>Índice cosecha</b>	mc	7582,180***	2,115	23,106**
	F	806,340	0,225	2,457

Los resultados de rendimiento y calidad del grano obtenidos en los cultivos de trigo, variedades *Avispa*, *Core* y trigo *Artur Nick*, junto con los resultados de cebada *Publican* se presentan como valores medios para cada variable dependiente de manera individual para cada uno de los genotipos.

Se ha utilizado como única variable independiente los tratamientos aplicados, por lo tanto se ha realizado el análisis del efecto de los distintos tratamientos en cada uno de los parámetros analizados.

En el **ensayo en cebada *Publican*** (Tabla 65) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos excepto para el peso seco del grano. Todos los tratamientos menos uno superan al Control fertilizado al 80 % llegando algunos a casi alcanzar el Control fertilizado al 100 %

El tratamiento con fertilizante mejorado que presentó los mejores resultados en rendimiento fue el Fertilizado con la cepa D7 con una mejora de un 22 % frente al Control sin fertilizar y un 14 % frente al Control Fertilizado al 80 %. Cabe destacar que el tratamiento de la cepa B4 sigue mejorando en un 25 % al Control sin fertilizar, un 12 % frente al Control fertilizado al 80 % aunque se encuentra a un 3 % del Control Fertilizado al 100 %.

Las combinaciones de cepas han presentado buenos resultados superando en algunos casos a cepas utilizadas de manera individual, como ha sucedido con los tratamientos con la cepa A7 y la cepa C4. Las mezclas también han mostrado tener efecto sobre la producción de biomasa según los datos de peso seco de la paja, siendo el tratamiento Fertilizado al 80 % recubierto con LCS0404 + B4 el que mejores resultado ha obtenido con 7115,5 kg / ha superando en más de

## Resultados

2000 Kg / ha, al Control sin fertilizar y en más de 1300 Kg / ha de paja al Control Fertilizado al 100 %.

**Tabla 65. Valores medios por tratamiento para el genotipo de cebada “Publican” en el ensayo de campo en Beja, de las diferentes variables dependientes se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para p<0,05.**

Tratamiento	Rendimiento (kg/ha)	Peso específico (kg/ha)	Humedad (%)	Peso seco grano (kg/ha)	Peso seco paja (kg/ha)	Índice de cosecha	
1 Control sin fertilizar	2923,5	71,95	8,57	2833,5	c	4666,5	45,47
4 Fertilización 80 % + C4	3245,5	69,40	8,50	3144,2	cb	6168,2	46,47
3 Control fertilizado 80 %	3278,3	69,45	8,50	3185,7	cc	5424,0	41,63
7 Fertilización 80 % + A7	3360,0	70,90	8,30	3248,7	cb	6376,2	39,20
9 Fertilización 80 % + D7 + B4	3559,0	70,35	8,47	3447,0	ba	7115,5	43,25
6 Fertilización 80 % + B4	3660,5	70,55	8,07	3532,2	ba	5467,7	37,80
8 Fertilización 80 % + D7 + A7	3711,2	71,00	8,32	3590,0	ba	6347,5	43,30
5 Fertilización 80 % + D7	3728,7	71,10	8,35	3606,7	ba	6018,2	39,45
2 Control fertilizado 100 %	3795,7	70,05	8,40	3674,0	a	5763,5	41,62
Grados de libertad	8	8	8	8	8	8	8
Cuadrados Medios	350241,986	2,594	0,95	307095,059	1959558,749	34,756	
F	2,296	0,948	1,026	3,055*	0,722	1,526	

El **ensayo de trigo de la variedad Core** (Tabla 66) se observa un efecto significativo de los tratamientos fertilizados frente al Control sin fertilizar, presentando diferencias en rendimiento, peso específico, peso seco del grano y en peso seco de la paja.

Los tratamientos con el 80 % de la dosis de fertilizante y las cepas individuales dieron mayor valor de cosecha que los tratamientos con el 80 % de la dosis de fertilizante y las cepas combinadas, y que los dos controles fertilizados, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Respecto al peso de la paja, no hubo diferencias entre los tratamientos fertilizados

En este caso el tratamiento Fertilizado con la cepa C4 y el Fertilizado con la B4, han obtenido los mejores resultados en los parámetros de rendimiento, peso seco del grano e índice de cosecha. Al igual que en el caso anterior, todos los tratamientos microbianos desarrollados en este estudio han superado al Control sin fertilizar y al Control Fertilizado al 100 % en el rendimiento. Sin embargo, en los parámetros de calidad del grano no muestran una clara mejora. En cuanto al índice de cosecha, el tratamiento que ha destacado ha sido el Fertilizado más C4.

Los tratamientos Fertilizados con la cepa B4 y la D7 fueron también evaluados en la variedad Core y mejoraron en rendimiento respecto al Control sin Fertilizar en un 25 % (B4) y 28 % (D7); y al Control Fertilizado al 100 % en un 12 % (B4) y 14 % (D7).

**Tabla 66. Valores medios por tratamiento para el genotipo de trigo “Core” en el ensayo de campo en Berengenilla, de las diferentes variables dependientes. Se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para  $p<0,05$ .**

Tratamiento	Rendimiento (kg/ha)	Peso específico (kg/ha)	Humedad (%)	Peso seco grano (kg/ha)	Peso seco paja (kg/ha)	Índice de cosecha
1 Control sin fertilizar	3545,0 b	76,87 a	13,85	3060,2 b	6113,0 b	33,02
2 Control fertilizado 100 %	4359,7 a	72,40 b	12,67	3808,2 a	7191,2 a	34,6
3 Control fertilizado 80 %	4365,0 a	72,65 b	12,70	3812,0 a	7171,2 a	34,67
8 Fertilización 80 % + D7 + A7	4365,0 a	72,60 b	12,72	3809,5 a	7224,7 a	34,5
7 Fertilización 80 % + A7	4443,2 a	73,25 b	12,92	3871,7 a	7171,2 a	34,97
9 Fertilización 80 % + D7 + B4	4480,0 a	72,67 b	12,87	3905,0 a	7263,0 a	34,92
5 Fertilización 80 % + D7	4523,5 a	73,02 b	12,75	3947,5 a	7128,0 a	35,65
6 Fertilización 80 % + B4	4611,7 a	73,62 b	12,75	4019,2 a	7211,2 a	35,77
4 Fertilización 80 % + C4	4616,7 a	72,55 b	12,75	4027,7 a	7113,2 a	36,15
Grados de libertad	8	8	8	8	8	8
Cuadrados Medios	420546,028	7,820	0,535	342492,736	518615,465	3,355
F	0,32*	2,461*	1,667	2,520*	10,719***	0,675

En el **ensayo con Trigo Avispa** en Rancho Paulo (Tabla 65) se observaron diferencias significativas para todos los parámetros analizados salvo para el peso específico. El único tratamiento que ha superado al control al 80 % fue el fertilizado con la cepa B4. Este tratamiento superó el 67 % al Control sin fertilizar, en 22,5 % al Control fertilizado al 100 % y en 6 % al Control fertilizado al 80 %.

La cepa B4 también presenta buenas aptitudes en cuanto a parámetros de calidad del grano como el peso específico, que es el más alto de todos los tratamientos y además el grano presentó baja humedad; y por último este tratamiento mejora la eficiencia del cultivo pues presenta el mayor índice de cosecha.

En este caso, el tratamiento fertilizado al 100 % dio menos cosecha y un poco más de paja que el tratamiento fertilizado al 80 % (Tabla 67).

**Tabla 67. Valores medios por tratamiento para el genotipo de trigo “Avispa” en el ensayo de campo en Rancho Paulo, de las diferentes variables dependientes se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ) y los**

## Resultados

resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para  $p < 0,05$ .

Tratamiento	Rendimiento (kg/ha)	Peso específico (Kg/hl)	Humedad (%)	Peso seco grano (kg/ha)	Peso seco paja (kg/ha)	Índice de cosecha
1 Control sin fertilizar	1299,7 c	70,92	16,50 a	1086,0 c	4562,5 b	19,20 d
2 Control fertilizado 100 %	1791,5 b	73,32	13,85 dcb	1543,7 b	5254,7 a	22,72 cb
8 Fertilización 80 % + D7 + A7	1808,2 b	71,05	14,75 b	1545,5 b	5244,7 a	22,70 c
7 Fertilización 80 % + A7	1828,2 b	71,25	14,67 cb	1560,7 b	5141,5 a	23,22 cba
9 Fertilización 80 % + D7 + B4	1848,0 b	70,27	14,57 cb	1579,2 b	5322,7 a	22,82 cba
4 Fertilización 80 % + C4	1910,0 ba	73,80	13,05 d	1662,2 ba	5153,0 a	24,32 ba
5 Fertilización 80 % + D7	2065,0 ba	72,67	13,47 dcb	1787,5 ba	5027,7 a	26,20 a
3 Control fertilizado 80 %	2075,0 ba	73,97	13,75 dcb	1789,7 ba	5191,2 a	25,65 a
6 Fertilización 80 % + B4	2195,0 a	74,55	13,22 dc	1905,5 a	5196,2 a	26,77 a
Grados de libertad	8	8	8	8	8	8
Cuadrados Medios	262326,465	9,913	4,541	220132,361	203281,257	21,539
F	6,345**	0,744	6,345***	6,518***	3,063*	7,013***

Las combinaciones de microorganismos dan valores de rendimiento más bajos que las cepas individuales, excepto para la cepa A7. Aunque, han presentado mejores resultados que el Control abonado al 100 % y el Control sin abonar.

En el **ensayo en trigo de la variedad Artur Nick** realizado se ha evaluado el efecto de los microorganismos (Tabla 68) todos los tratamientos inoculados, mejoraron los resultados en comparación con los controles del ensayo, incluido el control fertilizado al 100 %.

La cepa que presentó mejores resultados de rendimiento fue la A7. Las cuatro cepas de rizobios utilizadas de manera individual presentaron mejores resultados que las combinaciones estudiadas. La cepa que mayor producción de paja presentó fue la cepa C4.

El incremento de producción de grano que ha presentado el tratamiento fertilizado al 80 % con la cepa A7 supone casi un 13 % frente al control fertilizado al 100 %. En el caso de la C4 mejora el rendimiento el 7 % frente a dicho control y la B4, 3 %.

**Tabla 68. Valores medios por tratamiento para el genotipo de trigo “Artur Nick” en el ensayo de campo en Algarabejo, de las diferentes variables dependientes. Se incluyen también los resultados del ANOVA para la variable independiente “tratamiento” (cuadrados medios y valor de significación \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001) y los resultados de la separación de medias mediante la prueba LSD, de manera que por columnas, los valores seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas para p<0,05.**

Tratamiento	Rendimiento (kg/ha)	Peso específico (Kg/hl)	Humedad (%)	Peso seco grano (kg/ha)	Peso seco paja (kg/ha)	Índice de cosecha
1 Control sin fertilizar	3357,1 c	79,27	11,25	2979,4 c	1874,1 c	61,30
3 Control fertilizado 80 %	4050,7 b	79,75	11,02	3604,1 b	2535,7 b	58,91
2 Control fertilizado 100 %	4078,9 b	80,35	10,95	3632,7 b	2686,1 b	57,52
9 Fertilización 80 % + D7 + B4	4094,2 b	80,22	10,95	3642,3 b	2704,9 b	57,38
8 Fertilización 80 % + D7 + A7	4118,4 ba	79,42	11,15	3659,7 ba	2648,5 b	58,12
5 Fertilización 80 % + D7	4120,3 ba	80,40	11,12	3662,1 ba	2629,7 b	58,21
6 Fertilización 80 % + B4	4212,4 ba	79,65	11,35	3734,6 ba	2686,1 b	58,08
4 Fertilización 80 % + C4	4357,1 ba	79,37	10,68	3890,7 ba	3127,8 b	55,34
7 Fertilización 80 % + A7	4592,1 a	79,35	11,03	4086,9 a	2704,9 a	60,27
Grados de libertad	8	8	8	8	8	8
Cuadrados Medios	437905,541	0,825	0,154	354114,667	422714,838	11,784
F	4,028**	0,540	0,780	4,046**	5,679***	1,733

En cuanto a los resultados de rendimiento se ha realizado un análisis global de los cuatro genotipos (Tabla 69 y Figura 46). Se puede observar que los tratamientos que han presentado una mayor consistencia en los cuatro resultados han sido los que utilizaron cepas de manera individual, destacando el tratamientos Fertilizado al 80 % recubierto con las cepas B4, seguido del tratamiento con la D7.

Los tratamientos fertilizados con las cepas A7 y C4 han presentado mejores resultados en los ensayos de trigo que en el de cebada.

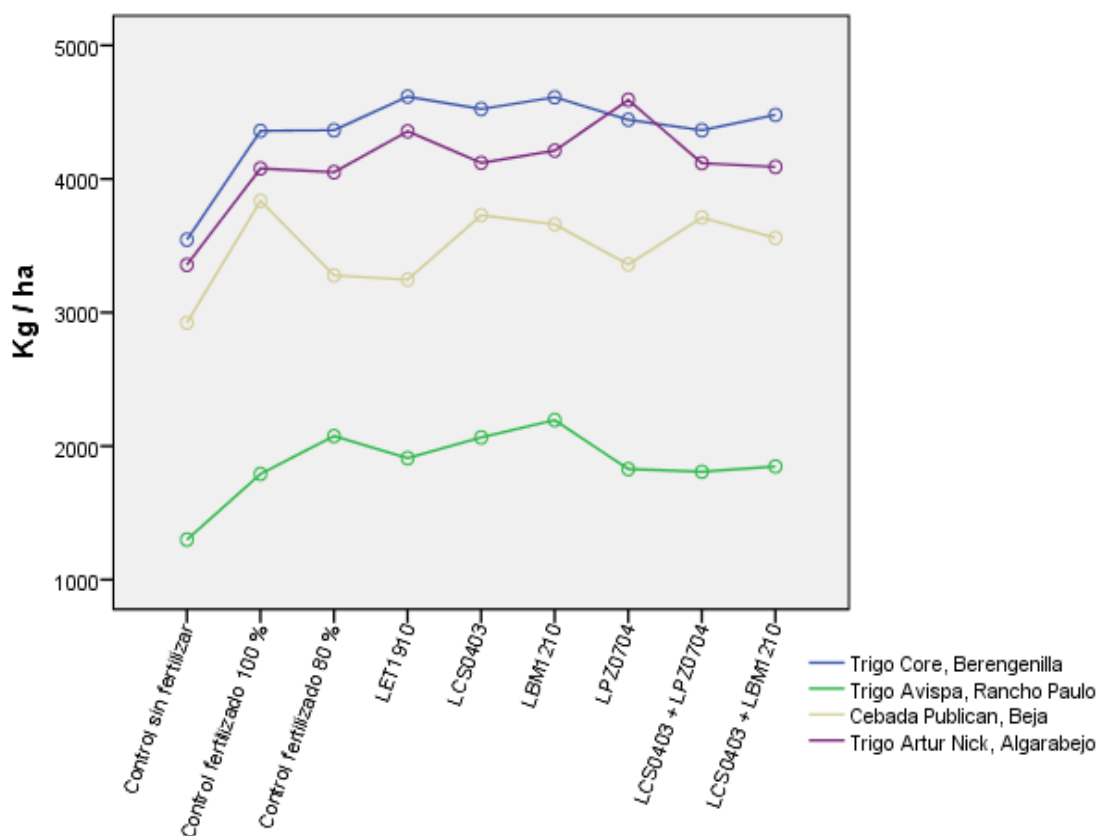
En Berengenilla y Algarabejo los tratamientos inoculados han superado a los tres testigos utilizados, incluso el fertilizado al 100 %. En Beja, no superaron al testigo fertilizado al 100 %, pero sí al fertilizado al 80 %, excepto la cepa C4.

En tres de cuatro ensayos las diferencias de rendimiento entre los tratamientos han presentado diferencias significativas.

## Resultados

**Tabla 69.** Tabla resumen de los distintos ensayos de campo ordenados de mayor a menor rendimiento en grano. Los tratamientos con microorganismos fueron diseñados con el 80 % de la fertilización recomendada.

Orden mejora	Rancho Paulo Trigo Avispa	Berengenilla Trigo Core	Beja Cebada Publican	Algarabejo Trigo Artur Nick
1º	B4	C4	Control fertilizado 100 %	A7
2º	Control fertilizado 80 %	B4	D7	C4
3º	D7 + B4	D7 + B4	D7 + A7	B4
4º	D7	D7	B4	D7
5º	C4	A7	D7 + B4	D7 + A7
6º	A7	D7 + A7	A7	D7 + B4
7º	D7 + A7	Control fertilizado 80 %	Control fertilizado 80 %	Control fertilizado 100 %
8º	Control fertilizado 100 %	Control fertilizado 100 %	C4	Control fertilizado 80 %
9º	Control sin fertilizar	Control sin fertilizar	Control sin fertilizar	Control sin fertilizar



**Figura 46.** Gráfico de rendimientos global para los cultivos estudiados.

## 4.6 Evaluación económica

Se ha estudiado la eficiencia de los distintos tratamientos mejorados frente a los controles. Además se ha incorporado un análisis económico en el cual se puede observar cómo repercute la utilización de los tratamientos mejorados en la economía de la explotación agraria.

En el ensayo de cebada *Publican* (Tabla 70) los resultados muestran cómo los tratamientos inoculados con rizobios superan al tratamiento fertilizado al 80 %, excepto el tratamiento con la cepa C4. En este caso, la eficiencia del abono en los tratamientos mejorados supera hasta en 13,8 % (cepa D7) al testigo fertilizado al 80 %, y, de manera global, los tratamientos inoculados presentan una mejora media de la eficiencia del 10 %. Esto se traduce en un incremento del margen bruto en la cosecha de 92 € / ha para el tratamiento con la cepa D7, y un incremento medio del mismo de 66,5 € / ha. En cuanto a los datos de incremento de rendimiento económico / UFT se observa que el tratamiento que mejores resultados ha presentado ha sido la cepa D7 con 0,55 y 5 de los 6 tratamientos mejorados con rizobios presentaron un incremento positivo.

En el ensayo de trigo *Core* (Tabla 71) se ha podido observar cómo la utilización de los rizobios ha mejorado en todos los casos. La eficiencia, tanto en datos absolutos como en relativos, ha presentado una mejora del 5,7 % en el tratamiento fertilizado con la cepa C4 respecto del tratamiento fertilizado al 80 %. Esto se ha reflejado con ganancias de 19,7 a 63,3 € / ha. En cuanto al incremento del rendimiento económico / UFT se observa que en 5 de los 6 tratamientos mejorados dicho incremento se sitúa entre 0,10 y 0,33.

En el ensayo de trigo *Avispa* (Tabla 72) las condiciones agroambientales fueron peores que en el resto de los ensayos y, dado que ha tenido un factor limitante ambiental, tan sólo la inoculación con la cepa B4 ha mejorado la eficiencia con respecto al tratamiento fertilizado al 80 %. Esto ha repercutido en el estudio económico y se observa que en el tratamiento con dicha cepa, se produce un incremento de 30,2 € / ha respecto al control fertilizado sin microorganismos, sin embargo fue el único tratamiento con incremento de rendimiento económico / UFT (0,12), mostrando el resto de tratamientos una disminución del mismo.

El ensayo de trigo *Arthur Nick* (Tabla 73), muestra una superioridad de todos los tratamientos inoculados con rizobios respecto a los testigos fertilizados al 80 % y al 100 %. De igual manera se puede observar una superioridad de los tratamientos con rizobios en la eficiencia relativa de 5 % de media; en el caso concreto de la cepa A7 la eficiencia mejora un 13,4 %. Esto se puede traducir en un incremento de 47 € / ha de media, y en la cepa A7 de 127,2 € / ha. En este ensayo el incremento del rendimiento económico / UFT se encuentra entre 0,05 y 0,62.

**Tabla 70. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo cebada V. *Publican*.**

Tratamiento	Rto <sup>(1)</sup> kg/ha	Abonado Kg/ha	UFT <sup>(1)</sup> /ha	Eficiencia		Precio cosecha €/ha	Gastos fertilizante €/ha	MBF <sup>(1)</sup> €/ha	Δ MBF <sup>(1)</sup> 80% €/ha	Δ RE/UFT <sup>(1)</sup>
				Kg/UFT	%					
Control sin fertilizar	2923,5	250 NAC 27 %	67,5	43,31	241,4	597,0	72,9	524,1	-21,5	-0,29
Fertilización 80 % + C4	3245,5	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	17,76	98,9	662,7	166,8	495,9	-6,7	-0,04
Control fertilizado 80 %	3278,3	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	17,94	100	669,4	166,8	502,6	0	0,00
Fertilización 80 % + A7	3360,0	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	18,39	102,5	686,1	166,8	519,3	16,7	0,10
Fertilización 80 % + D7 + B4	3559,0	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	19,48	108,6	726,7	166,8	559,9	57,3	0,34
Fertilización 80 % + B4	3660,5	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	20,04	111,7	747,4	166,8	580,6	78	0,47
Fertilización 80 % + D7 + A7	3711,2	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	20,31	113,2	757,8	166,8	591,0	88,4	0,53
Fertilización 80 % + D7	3728,7	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	182,7	20,41	113,8	761,4	166,8	594,6	92	0,55
Control fertilizado 100 %	3795,7	300 12/24/12 + 250 NAC 27 %	211,5	17,95	100	775,0	190,3	584,7	82,1	0,43

**Tabla 71. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo trigo duro V. *Core*.**

Tratamiento	Rto <sup>(1)</sup> kg/ha	Abonado Kg/ha	UFT <sup>(1)</sup> / ha	Eficiencia		Precio cosecha €/ha	Gastos fertilizante €/ha	MBF <sup>(1)</sup> €/ha	Δ MBF <sup>(1)</sup> 80% €/ha	Δ RE/UFT <sup>(1)</sup>
				Kg/UFT	%					
Control sin fertilizar	3545,0	150 Urea + 250 NAC 27%	109,5	32,37	157,1	891,4	107,1	784,2	-124,1	-1,16
Control fertilizado 100 %	4359,7	200 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	237,5	18,36	89,1	1096,2	209,8	886,4	-21,9	-0,10
Control fertilizado 80 %	4365,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	20,60	100	1097,5	189,2	908,3	0	0,00
Fertilización 80 % + D7 + A7	4365,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	20,60	100	1097,5	189,2	908,3	0	0,00
Fertilización 80 % + A7	4443,2	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	20,97	101,2	1117,2	189,2	928,0	19,7	0,10
Fertilización 80 % + D7 + B4	4480,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	21,14	102,6	1126,5	189,2	937,2	28,9	0,15
Fertilización 80 % + D7	4523,5	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	21,35	103,6	1137,4	189,2	948,2	39,9	0,21
Fertilización 80 % + B4	4611,7	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	21,76	105,6	1159,6	189,2	970,3	62,0	0,33
Fertilización 80 % + C4	4616,7	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	211,9	21,78	105,7	1160,8	189,2	971,6	63,3	0,33

(1) Rto: Rendimiento; UFT: Unidades Fertilizantes Totales; MBF: Margen Bruto en Fertilización; Δ MBF respecto a la fertilización al 80 %: Incremento Margen Bruto respecto al control 80 % en fertilización e Δ RE / UFT: Incremento del rendimiento económico / UFT respecto a la fertilización al 80 %.



**Tabla 72. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo trigo duro V. Avispa.**

Tratamiento	Rto <sup>(1)</sup> kg/ha	Abonado Kg/ha	UFT <sup>(1)</sup> / ha	Eficiencia		Precio cosecha €/ha	Gastos fertilizante €/ha	MBF <sup>(1)</sup> €/ha	Δ MBF <sup>(1)</sup> 80% €/ha	Δ RE/UFT <sup>(1)</sup>
				Kg/UFT	%					
Control sin fertilizar	1299,7	150 Urea +250 NAC 27%	135	9,63	110,4	326,8	177,7	149,1	-112,8	-0,63
Control fertilizado 100 %	1791,5	200 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	263	6,81	78,1	450,5	280,3	170,2	-91,7	-0,33
Fertilización 80 % + D7 + A7	1808,2	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	7,60	87,2	454,7	259,8	194,9	-67	-0,26
Fertilización 80 % + A7	1828,2	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	7,68	88,1	459,7	259,8	199,9	-62	-0,24
Fertilización 80 % + D7 + B4	1848,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	7,76	89	464,7	259,8	204,9	-57,1	-0,22
Fertilización 80 % + C4	1910,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	8,03	92,1	480,3	259,8	220,5	-41,4	-0,16
Fertilización 80 % + D7	2065,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	8,68	99,5	519,2	259,8	259,4	-2,5	-0,01
Control fertilizado 80 %	2075,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	8,72	100	521,7	259,8	261,9	0	0,00
Fertilización 80 % + B4	2195,0	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	238	9,22	105,7	551,9	259,8	292,1	30,2	0,12

**Tabla 73. Análisis de la eficiencia de los tratamientos y evaluación económica del ensayo trigo blando V. Arthur Nick.**

Tratamiento	Rto <sup>(1)</sup> kg/ha	Abonado Kg/ha	UFT <sup>(1)</sup> /ha	Eficiencia		Precio cosecha €/ha	Gastos fertilizante €/ha	MBF <sup>(1)</sup> €/ha	Δ MBF <sup>(1)</sup> 80% €/ha	Δ RE/UFT <sup>(1)</sup>
				Kg/UFT	%					
Control sin fertilizar	3357,1	150 Urea 46 %	69	48,65	265,4	788,3	63,4	724,9	-22	-0,35
Control fertilizado 80 %	4050,7	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	18,33	100	951,1	204,2	746,9	0	0,00
Control fertilizado 100 %	4078,9	500 8/15/15 + 150 Urea 46 %	259	15,75	85,92	957,8	239,4	718,4	-28,5	-0,12
Fertilización 80 % + D7 + B4	4094,2	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	18,53	101,1	961,4	204,2	757,2	10,3	0,05
Fertilización 80 % + D7 + A7	4118,4	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	18,64	101,7	967,0	204,2	762,8	15,9	0,08
Fertilización 80 % + D7	4120,3	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	18,64	101,7	967,5	204,2	763,3	16,4	0,08
Fertilización 80 % + B4	4212,4	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	19,06	104,0	989,1	204,2	784,9	38	0,19
Fertilización 80 % + C4	4357,1	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	19,72	107,6	1023,1	204,2	818,9	72	0,35
Fertilización 80 % + A7	4592,1	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	221	20,78	113,4	1078,3	204,2	874,1	127,2	0,62

(1) Rto: Rendimiento; UFT: Unidades Fertilizantes Totales; MBF: Margen Bruto en Fertilización; Δ MBF respecto a la fertilización al 80 %: Incremento Margen Bruto respecto al control 80 % en fertilización e Δ RE / UFT: Incremento del rendimiento económico / UFT respecto a la fertilización al 80 %..

## 4.7 Evaluación ambiental

En el estudio sobre la influencia de los fertilizantes con tratamientos microbianos sobre las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera por parte del cultivo, se ha comprobado que cuando las condiciones ambientales son favorables, la utilización de estos tratamientos produce una reducción de las emisiones de gases efecto invernadero a la atmósfera por tonelada de cereal producido.

El ensayo de cebada *Publican* (Tabla 74) todos los tratamientos microbianos presentan una reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub> / t de producto, excepto el tratamiento con la cepa C4. El tratamiento que presentó una reducción mayor de las emisiones (14 kg de CO<sub>2</sub> / t) fue el tratamiento con la cepa D7. En este ensayo, la media de reducción de los fertilizantes mejorados fue de 10,2 kg de CO<sub>2</sub> / t de cebada.

Respecto al ensayo con trigo *Core* (Tabla 75) la reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub> fueron mayores en el tratamiento con la cepa C4 llegando a 7 kg de CO<sub>2</sub> Eq / t de trigo. La media de reducción de las emisiones de los tratamientos microbianos fue de 3,8 kg de CO<sub>2</sub> Eq / t de trigo. En este ensayo 5 de 6 fertilizantes con tratamientos microbianos presentan una reducción de las emisiones de gases efecto invernadero en comparación con el testigo fertilizado al 80 % y el testigo fertilizado al 100 %.

En el ensayo de trigo *Avispa* (Tabla 76) se puede observar como el tratamiento del fertilizante al 80 % con la cepa B4 produce una reducción de 19 kg de CO<sub>2</sub> Eq / t de trigo producido, a pesar de que las condiciones agroambientales fueron peores y los rendimientos menores que en el resto de los ensayos.

En el ensayo de trigo *Arthur Nick* (Tabla 77) los 6 tratamientos con rizobios han presentado reducciones de las emisiones de gases efecto invernadero en comparación con el tratamiento fertilizado sin microorganismos una media de 5,5 kg de CO<sub>2</sub> / t. La cepa que más disminuyó la huella de carbono en el cultivo fue la cepa A7 con 14 kg de CO<sub>2</sub> / t de trigo.

Se ha demostrado que los tratamientos microbianos son capaces de producir más kg de grano / ha, debido a que ha aumentado la eficiencia de producción del cultivo del cereal, lo que origina, como consecuencia la disminución de la huella de carbono. Esto ha sido más manifiesto cuando las condiciones agroambientales del cultivo han sido favorables para el cultivo del cereal.

**Tabla 74. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de cebada *Publican*.**

Tratamiento	Rendimiento kg/ha	Abonado Kg/ha	Emisiones CO <sub>2</sub>		
			Fijas cultivo kg CO <sub>2</sub> Eq / t	Variables fertilización kg CO <sub>2</sub> Eq / ha	Totales Kg CO <sub>2</sub> Eq/ t
Control sin fertilizar	2923	250 NAC 27 %	176,8	247,2	262
Fertilización 80 % + C4	3245	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	299
Control fertilizado 80 %	3278	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	297
Fertilización 80 % + A7	3360	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	295
Fertilización 80 % + D7 + B4	3559	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	288
Fertilización 80 % + B4	3660	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	285
Fertilización 80 % + D7 + A7	3711	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	283
Fertilización 80 % + D7	3728	240 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	394,9	283
Control fertilizado 100 %	3795	300 12/24/12 + 250 NAC 27 %	176,8	430,8	291

**Tabla 75. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de trigo duro *Core*.**

Tratamiento	Rendimiento kg/ha	Abonado Kg/ha	Emisiones CO <sub>2</sub>		
			Fijas cultivo kg CO <sub>2</sub> Eq / t	Variables fertilización kg CO <sub>2</sub> Eq / ha	Totales Kg CO <sub>2</sub> Eq/ t
Control sin fertilizar	3545	150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	490,7	363
Control fertilizado 100 %	4359	200 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	604,5	364
Control fertilizado 80 %	4365	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	358
Fertilización 80 % + D7 + A7	4365	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	358
Fertilización 80 % + A7	4443	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	356
Fertilización 80 % + D7 + B4	4480	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	355
Fertilización 80 % + D7	4523	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	354
Fertilización 80 % + B4	4611	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	351
Fertilización 80 % + C4	4616	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	581,9	351

**Tabla 76. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de trigo duro *Avispa*.**

Tratamiento	Rendimiento kg/ha	Abonado Kg/ha	Emisiones CO <sub>2</sub>		
			Fijas cultivo kg CO <sub>2</sub> Eq / t	Variables fertilización kg CO <sub>2</sub> Eq / ha	Totales Kg CO <sub>2</sub> Eq/ t
Control sin fertilizar	1299	150 Urea + 250 NAC 27%	225,2	664,9	737
Control fertilizado 100 %	1791	200 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	778,7	660
Fertilización 80 % + D7 + A7	1808	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	643
Fertilización 80 % + A7	1828	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	639
Fertilización 80 % + D7 + B4	1848	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	634
Fertilización 80 % + C4	1910	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	621
Fertilización 80 % + D7	2065	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	591
Control fertilizado 80 %	2075	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	589
Fertilización 80 % + B4	2195	160 DAP + 150 Urea + 250 NAC 27% + NA 33,5 %	225,2	756,2	570

**Tabla 77. Análisis de la huella de CO<sub>2</sub> del ensayo de trigop blando *Arthur Nick*.**

Tratamiento	Rendimiento kg/ha	Abonado Kg/ha	Emisiones CO <sub>2</sub>		
			Fijas cultivo kg CO <sub>2</sub> Eq / kg	Variables fertilización kg CO <sub>2</sub> Eq / ha	Totales Kg CO <sub>2</sub> Eq/ t
Control sin fertilizar	3357	150 Urea 46 %	225,2	243,3	297
Control fertilizado 80 %	4051	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	346
Control fertilizado 100 %	4079	500 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	551,0	360
Fertilización 80 % + D7 + B4	4094	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	345
Fertilización 80 % + D7 + A7	4118	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	344
Fertilización 80 % + D7	4120	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	344
Fertilización 80 % + B4	4212	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	341
Fertilización 80 % + C4	4357	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	337
Fertilización 80 % + A7	4592	400 8/15/15 + 150 Urea 46 %	225,2	489,5	332

## **5 Discusión**



## 5.1 Supervivencia de los rizobios cuando se aplican sobre el abono

La supervivencia de los microorganismos en el suelo está condicionada por una serie de factores, como la temperatura, el pH, el contenido en nutrientes (relación  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , el contenido de  $\text{Al}^{3+}$ , de iones fosfato  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , etc), la salinidad y la sodicidad, el agua y aire en el suelo, también el tipo de planta y los exudados radiculares producidos y además, las prácticas agrarias y las condiciones climáticas (Deaker *et al.* 2004, Vriezen *et al.* 2007, Chalk *et al.* 2006, Faoro *et al.* 2010, Chaparro *et al.* 2012). Dichos factores presentan modos de acción complejos y frecuentemente existen interacciones entre ellos, por estos motivos la curva modelo de cinética de la mortalidad, en numerosos casos se puede aproximar a una curva exponencial negativa. Debido a estos factores, la supervivencia depende en gran medida de que los microorganismos se encuentren bien protegidos.

En el caso concreto de *Rhizobium*, la temperatura de crecimiento ronda los 25 °C, sobreviven entre pH 4-10 y a concentraciones de sal, NaCl 1-8 % p/v y son más vulnerables al estrés cuando se encuentran en vida libre que en las relaciones de simbiosis (Raza *et al.* 2001, Chalk *et al.* 2006).

Los inoculantes sólidos utilizan diversos tipos de sustratos en los cuales las células microbianas van adsorbidas o embebidas. El soporte constituye la mayor porción del inoculante, facilita el manejo, distribución y el uso, pero lo más importante es que protege al microorganismo de factores adversos que comprometen su viabilidad. El soporte sólido más ampliamente utilizado ha sido, y sigue siendo la turba (Bedman *et al.* 2006). Los soportes para los microorganismos de los ensayos en esta tesis han sido la turba, aplicada a las semilla de manera tradicional (Albareda *et al.* 2009), y el propio fertilizante, el cual fue recubierto por una doble capa de microorganismos.

En algunos soportes es posible que el microorganismo siga multiplicándose después de la mezcla con el cultivo bacteriano, incrementando la población para luego durante el almacenamiento ir decayendo con el tiempo. En el caso de la turba sí es probable que los microorganismos inoculados sigan multiplicándose, sin embargo al utilizar el mismo fertilizante como soporte complica la supervivencia y multiplicación de los microorganismos debido a que las células microbianas están recubriendo directamente los gránulos del abono en contacto con las sales minerales.

La recuperación de rizobios tras el ensayo en suelo estéril (Apartado 4.1.1) indicó que en contra de lo esperado, la supervivencia fue mayor cuando se utilizó como soporte el propio fertilizante, obteniéndose  $10^4$  UFC / g de suelo tras el ensayo, a pesar de que la inoculación con turba se

## Discusión

realizó directamente en la semilla, a diferencia del fertilizante que se aplicó en la superficie del mismo.

Desde hace años, se conoce que los *Rhizobium* de crecimiento rápido presentan una mayor tolerancia al estrés salino que los *Bradyrhizobium*, pero también dicha tolerancia depende del valor de pH, temperatura, fuente de carbono y presencia o no de osmoprotectores (Elsheikh, 1998). A día de hoy, se conoce que los exopolisacáridos de *Rhizobium* juegan un papel importante en la tolerancia al estrés salino (Upadhyay *et al.* 2011). A pesar de esta halotolerancia de las cepas de *Rhizobium* no se conocen estudios publicados de recubrimiento de los fertilizantes minerales sólidos con microorganismos, aunque existen ensayos publicados en los cuales se utilizan microorganismos y se realizan fertilizaciones, pero en ningún caso el inoculante va recubriendo los gránulos de abono, por lo tanto este aspecto resulta innovador en este trabajo.

No obstante, se han evaluado multitud de soportes para bacterias del género *Rhizobium*, se están desarrollando formulaciones líquidas como suero de leche, lodos, soluciones de NaCl y carboximetilcelulosas (Rebah *et al.* 2007, França *et al.* 2013) y formulaciones sólidas como turba, residuos de la industria del corcho, sepiolita, sílice, carbón, alginato, bagazo de caña de azúcar, serrín, perlita, carbón vegetal, corteza de arroz, salvado de trigo y vermicompost (Alvareda *et al.* 2009, Daza *et al.* 2000, Mendes y Videira. 2005, Arora *et al.* 2008, Khavazi *et al.* 2007, Kalra *et al.* 2010, Pandey *et al.* 2010, Malusá *et al.* 2012).

En cuanto a la producción de biomasa en trigo del ensayo sobre suelo estéril (Apartado 4.1.2), el desarrollo vegetal fue superior cuando el fertilizante se recubrió con microorganismos frente al testigo fertilizado. Este efecto en suelo estéril, podría explicarse porque las rizobacterias promotoras del crecimiento colonizan mejor y de manera más eficiente los suelos con baja biomasa microbiana (Fließbach *et al.* 2009, Chaparro *et al.* 2012). No obstante, estudios realizados en este trabajo han demostrado eficacia de los microorganismos en suelo real bajo condiciones controladas y también en condiciones de campo.

En el ensayo de trigo en invernadero sobre suelo real (Apartado 4.1.3), los tratamientos con el fertilizante recubierto con microorganismos presentan mejores resultados que cuando los microorganismos se aplican en la semilla con turba como soporte. Estos resultados podrían ser debidos a que los flavonoides de la cubierta de las semillas son antioxidantes (Debeaujon *et al.* 2007) y tienen función antimicrobiana (Winkel-Shirley, 2002).



## 5.2 Propiedades PGP (Plant Growth Promoting) *in vitro* y su posible influencia en el desarrollo de los cultivos

El mayor reto en el estudio del suelo es entender cómo las propiedades químicas, físicas y biológicas afectan a la producción (Burns *et al.* 2013). La asociación planta-microorganismo proporciona mecanismos PGP que facilitan la mayor producción de los cultivos de una manera sostenible (Weyens *et al.* 2009). Las principales actividades de las bacterias PGPR están relacionadas con el *quorum sensing*, la quimiotaxis, la movilidad y la producción de distintos bioactivadores como vitaminas, aminoácidos, promotores del crecimiento, fitohormonas, metabolitos, sideróforos, compuestos volátiles, enzimas y antibióticos (Babalola. 2010).

Los mecanismos indicados se pueden agrupar en tres principales acciones: la síntesis de compuestos útiles para las plantas, el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes y la mejora de la salud de las plantas mediante el control de las enfermedades. Sin embargo, no nos podemos olvidar de acciones tan importantes como el mantenimiento de la estructura del suelo debida a la estabilización de los agregados, el incremento del contenido en materia orgánica del mismo y finalmente el incremento de la actividad enzimática del suelo, parámetro utilizado como indicador de la calidad biológica del suelo (Hayat *et al.* 2010).

Según se ha demostrado en los ensayos desarrollados en este estudio en plantas de trigo y cebada, los datos correspondientes a las pruebas PGPR *in vitro* de los microorganismos no determinan de una manera clara la eficacia *in vivo*. No cabe duda de que los microorganismos estimulan el crecimiento de las plantas, pero debido a las múltiples interacciones que se producen en la rizosfera se hace imposible asignar dicho efecto a una propiedad concreta; de hecho, la mayoría de las bacterias presentan varias propiedades PGP de manera simultánea. Además, existen otros factores en la rizosfera que influyen en el efecto producido por los microorganismos en las plantas, como por ejemplo la producción de enzimas extracelulares. Por lo tanto, los resultados obtenidos en los ensayos, se consideran debidos a un global de acciones conocidas y desconocidas que tienen lugar en la rizosfera (Glick. 2012).

A pesar de las dificultades para asignar un posible efecto estimulante del desarrollo de los cultivos a una propiedad en concreto, en esta tesis se han analizado cuatro propiedades o características de los rizobios que podrían aportar un beneficio para las plantas con respecto a otros que no las presentan.

### 5.2.1 Solubilización de fósforo

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes del crecimiento vegetal y de la producción de los cultivos (Wissuwa. 2003, Khan *et al.* 2007). Existen diversos microorganismos de la rizosfera que presentan la capacidad de solubilización del fosfato inorgánico, sin embargo los más eficientes pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Rhizobium* y *Pseudomonas* en bacterias y en el caso de los hongos, a *Aspergillus* y *Penicillium* (Poonguzhali *et al.* 2008, Zaidi *et al.* 2009, Singh *et al.* 2011, Saharan y Nehra. 2011).

Los resultados obtenidos en la prueba de solubilización de fosfato *in vitro* realizada a las distintas cepas de *Rhizobium* muestran que la B4 y la B3 son capaces de mejorar la disponibilidad de este nutriente (Apartado 4.2.1). Estos resultados coinciden con que *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* es capaz de solubilizar fosfato inorgánico en arroz (Yanni *et al.* 2001). Dentro del mismo género, se ha evaluado esta propiedad en otras especies de *Bradyrhizobium* (Deshwal *et al.* 2003, Canbolat *et al.* 2006), y recientemente se ha demostrado que *Rhizobium leguminosarum* incrementa el contenido en P en las partes comestibles y los frutos de tomate, pimiento, lechuga y zanahoria (García-Fraile *et al.* 2012, Flores-Félix *et al.* 2013).

### 5.2.2 Producción de Ácido Indolacético

La producción de hormonas como el IAA es posiblemente el principal mecanismo de estimulación del crecimiento en plantas (Machado *et al.* 2013). El IAA estimula el crecimiento de raíces y pelos radiculares, aumentando su densidad y mejorando la absorción de nutrientes del suelo. A día de hoy, se conocen múltiples rutas redundantes de formación del IAA a través de la IAA sintasa (Pollmann *et al.* 2009).

Es un hecho bien constatado que la mayoría de los rizobios, si no todos, producen ácido indolacético en los cultivos suplementados con triptófano, y esta auxina es esencial para desencadenar los primeros estadios en la formación del nódulo radical en la simbiosis con leguminosas (Bedmar *et al.* 2006).

Los resultados de producción de IAA muestran que todos los rizobios analizados producen ácido indolacético; sin embargo, se seleccionaron las cinco cepas más productoras C4, C2, D7, C3 y A9, con cantidades de 7,6 a 11,6  $\mu\text{g}$  de IAA/ $10^8$  UFC (Apartado 4.2.2 Tabla 46). Estos resultados coinciden con los numerosos artículos que demuestran como diferentes especies de *Rhizobium* son productoras de IAA (Wani *et al.* 2007; Zahir *et al.* 2010, Ahemad y Khan. 2011, Ahemad y Khan 2012, Ahemad *et al.* 2013, Yanni *et al.* 2001, García-Fraile *et al.* 2012, Machado *et al.* 2013, Humphry *et al.* 2007, Mehboob *et al.* 2009, Bhattacharjee *et al.* 2012).

### 5.2.3 Producción de sideróforos

El hierro es un elemento esencial para la vida de casi todos los microorganismos porque actúa como catalizador en procesos enzimáticos, en el metabolismo del oxígeno, como transportador de electrones, e interviene en la síntesis de ADN y ARN (Aguado-Santacruz *et al.* 2012). Debido a la baja disponibilidad del hierro en el medio ambiente, a pesar de su abundancia en formas no asimilables, los microorganismos han desarrollado estrategias como la producción de sideróforos (Ahmed y Holmström. 2014).

Los sideróforos son sustancias de bajo peso molecular producidas biosintéticamente por bacterias, levaduras, hongos y plantas para buscar y ligar el  $\text{Fe}^{3+}$  insoluble, por el cual tienen una afinidad extremadamente alta (Chu *et al.* 2010). Los sideróforos son capaces de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  que es soluble y puede ser asimilado por las plantas. De los microorganismos analizados, las cepas que produjeron sideróforos en mayor o menor medida fueron las siguientes: A11, C4, C2 y C9 (Apartado 4.2.3).

### 5.2.4 Actividad ACC desaminasa

El crecimiento de las plantas en el campo puede ser inhibido por numerosos tipos de estrés biótico y abiótico. Dentro de los tipos de estrés abiótico, se encuentran por ejemplo las temperaturas, tanto altas como bajas, la salinidad, el estrés hídrico por sequía o la anoxia por inundación, los contaminantes, la radiación y el exceso de luz, entre otros. En los tipos de estrés biótico nos encontramos con las propias heridas de las plantas, la depredación por insectos y nematodos y el ataque de hongos, bacterias y virus (Glick *et al.* 2007). Uno de los mecanismos de las plantas para defenderse de los diferentes tipos de estrés es mediante disminución de los niveles de etileno, compuesto que se produce en estas situaciones en las plantas (Barnawal *et al.* 2012). La enzima ACC desaminasa producida por las bacterias es capaz de degradar el precursor del etileno y evitar que las plantas lo produzcan en situaciones de estrés (Shahzad *et al.* 2013).

Los resultados de la prueba (Apartado 4.2.4 Tabla 47) muestran la capacidad de las bacterias para sintetizar la enzima ACC desaminasa que hidroliza el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) precursor del etileno. Los resultados muestran que existe actividad ACC desaminasa cuando las bacterias crecen en un medio con ACC como fuente de N. Las siguientes cepas de *Rhizobium* presentaron los mejores resultados de actividad ACC desaminasa A7, A11 y E2.

Resulta extraño que tan sólo tres cepas presentaran actividad ACC desaminasa en *Rhizobium*, porque se ha demostrado que en el proceso de nodulación en la simbiosis rizobio-leguminosa, la planta responde sintetizando etileno, mientras que el rizobio lo hace sintetizando ACC

desaminasa y lo transforma en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato, evitando así la síntesis del etileno en el proceso de la simbiosis (Murset *et al.* 2012).

### 5.2.5 Otros mecanismos de acción de las PGPR

Continuamente se están descubriendo nuevas propiedades beneficiosas de los microorganismos que sirven para enfatizar el efecto positivo que tienen sobre las plantas. En esta tesis, se han seleccionado las cuatro propiedades PGPR de mayor interés para la mejora de la producción de los cultivos y se han evaluado los microorganismos seleccionados. Pero existen muchos otros mecanismos de estimulación del crecimiento.

Por ejemplo el efecto de **biocontrol**, que engloba acciones directas como la competencia por los nutrientes, la síntesis de compuestos antimicrobianos, la producción de enzimas líticas o la degradación de factores de virulencia, y también acciones indirectas como la activación de los mecanismos de defensa de las plantas (ISR y SAR) (Compant *et al.* 2005). Es muy probable que los microorganismos estudiados en esta tesis, posean algún tipo de mecanismos de control biológico.

Recientemente se ha demostrado que los exopolisacáridos producidos por las rizobacterias juega un papel importante en la tolerancia frente al **estrés salino** mitigándolo, al reducir el contenido en sodio disponible en los suelos salinos (Upadhyay *et al.* 2011). No podemos olvidar que los rizobios son grandes productores de exopolisacáridos, por lo que es posible que presentaran buenos resultados en pruebas de halotolerancia. Por este motivo, en este trabajo se ha considerado posible la utilización de estos microorganismos para su utilización recubriendo al fertilizante. Se ha demostrado que ciertas bacterias halotolerantes presentan un potencial real de estimulación de crecimiento, debido a la actividad ACC desaminasa (Siddikee *et al.* 2010). Dado que los rizobios pueden poseer actividad ACC desaminasa y producir exopolisacáridos, presentan buenas aptitudes para su utilización recubriendo los gránulos de fertilizantes minerales.

Otro de los pasos que sería interesante realizar para completar el análisis de las propiedades beneficiosas microorganismos, es el estudio del efecto sobre la **actividad fotosintética**, pues se ha demostrado que ciertas rizobacterias provocan un incremento de esta actividad, además de mejorar la gestión del agua e incrementar el contenido de clorofila (Stefan *et al.* 2013, Suzuki *et al.* 2014).

Se debe tener en cuenta que las PGPR de la rizosfera producen **enzimas extracelulares** que son liberadas en su metabolismo y tras la muerte celular. El funcionamiento de este ecosistema presenta como base procesos enzimáticos que intervienen en la mayoría de las transformaciones

químicas que se producen en el suelo. La actividad enzimática del suelo nos sirve para conocer la actividad global de la rizosfera (Nannipieri *et al.* 2012). Las enzimas del suelo más estudiadas con el fin de incrementar la eficiencia en el uso de los nutrientes por las plantas, son las oxidoreductasas (deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas) y las hidrolasas (sobre todo fosfatasas, proteasas y ureasa) (Shen *et al.* 2013).

Una vez conocidas las propiedades beneficiosas de los microorganismos, se deberían tener en cuenta los factores que afectan a la microbiota del suelo y condicionan su actuación, como el pH, el tipo de planta, el agua, los exudados de la planta debido a los distintos estados de desarrollo, las prácticas agrarias y las condiciones climáticas (Chaparro *et al.* 2012).

### **5.3 Efecto de los rizobios en planta a nivel de microcosmos**

En las últimas décadas, diferentes estudios han resaltado el efecto de los microorganismos sobre el ecosistema del suelo. Los principales efectos provocados por estos microorganismos tanto PGPR como micorrizas arbusculares, se pueden resumir en la mejora de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, la mineralización de la materia orgánica del suelo, mejora de la estructura del suelo y el control de los microorganismos patógenos (Miransari. 2011). Dentro del global de las bacterias edáficas, las que habitan en la rizosfera son mucho más eficientes en el transporte, movilización y solubilización de nutrientes en comparación con aquellas bacterias del suelo alejadas de las raíces de las plantas (Hayat *et al.* 2010, Ahemad y Kibret. 2014). Por este motivo, las rizobacterias constituyen la fuerza dominante en el ciclo de los nutrientes del suelo y son cruciales para su fertilidad (Glick. 2012).

Las PGPR proporcionan claros beneficios a las plantas. A corto plazo, se ha demostrado que mejoran el establecimiento de las plantas mediante la aceleración del desarrollo radicular, provocando un mejor acceso a los nutrientes y al agua, haciendo a las plantas capaces de competir con las malas hierbas, reduciendo así las necesidades de herbicidas (Biswas *et al.* 2000). A largo plazo, los beneficios se traducen en la mejora del crecimiento, la salud y la supervivencia de las plantas, debido a que presentan una mejor respuesta frente a patógenos en situaciones de estrés biótico y abiótico, lo cual repercute en parte en una disminución de las necesidades de pesticidas en los cultivos (Weyens *et al.* 2009). En concreto los rizobios presentan una gran ventaja frente a otros microorganismos PGPR, son microorganismos con muy poca probabilidad de producir enfermedad en humanos, lo cual ha sido comprobado durante siglos de simbiosis rizobio-leguminosa (García-Fraile *et al.* 2012).

Por estos motivos, resulta de gran interés el análisis del efecto que presenta la inoculación con rizobios en cultivos de cereal, las posibles causas de dicho efecto y el nivel de interacción que

existe entre ellos y las raíces de plantas, aspectos desarrollados en la primera parte de este estudio.

### **5.3.1 Efecto de la dosis de rizobios**

El uso de los fertilizantes minerales, especialmente del nitrógeno y el fósforo, ha provocado el incremento en la producción de los cultivos. Esto es debido a que la mayor parte de los suelos agrícolas son deficitarios en uno o más nutrientes esenciales o presenta alguna otra limitación para obtener pleno rendimiento (Espinosa y García. 2013). De hecho, no se podría eliminar el uso de los fertilizantes químicos sin una dramática disminución de la producción de alimentos (Adesemoye y Kloepper. 2009).

Los inoculantes microbianos integran soluciones agroambientales debido a que poseen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, mejoran la disponibilidad y la absorción de nutrientes, mejoran la salud de las plantas e incrementan la producción de la cosecha (Adesemoye y Kloepper. 2009, Singh *et al.* 2011).

Todo ello ha llevado a considerar la posibilidad de suplementar los fertilizantes químicos con microorganismos, mejorando de esta manera la eficiencia en el uso de los nutrientes y disminuyendo las pérdidas al medioambiente (Naveed *et al.* 2008).

#### **Optimización de la dosis de inoculante en cebada**

Resulta crucial la cuantificación del número de células viables para la evaluación de la efectividad de un producto en el cual se utilizan los microorganismos como base (Rose *et al.* 2011). Debido a esto, en el ámbito de los productos microbianos se han desarrollado métodos de cuantificación del número de células viables por unidad de peso de inoculante (Penna *et al.* 2011). Los estándares de concentración de microorganismos en los inoculantes varían con el país, pero la mayoría presenta un rango de  $10^7$  -  $10^9$  células de *Rhizobium* / g de inoculante fresco.

Surge la cuestión de si la concentración de microorganismos del suelo es suficiente para que las bacterias ejerzan la acción PGP sobre la planta de trigo. Para los datos obtenidos en el recuento de microorganismos del suelo del ensayo de trigo en cámara de cultivo, la concentración de 100 bacterias por g de suelo resulta baja, si se compara con la cantidad de rizobios recomendados para garantizar la nodulación de un cultivo de leguminosa (Hirsch. 1996) que se encuentra en torno a  $10^4$  rizobios por g de suelo, aunque no hay datos sobre la cantidad de microorganismos necesarios para provocar el efecto de estimulación del crecimiento en cereal.

En el ensayo para optimizar la dosis en cebada (Apartado 4.3), se partió de cultivos puros a una concentración de  $10^9$  UFC / mL. Sin embargo las concentraciones aplicadas en el ensayo fueron

las siguientes:  $10^3$  UFC / g de suelo, que sería la concentración de bacterias que inicialmente se depositarían en suelo con el fertilizante recubierto,  $10^4$  UFC / g de suelo la concentración recomendada para asegurar la acción de nodulación de los rizobios en las leguminosas, 26 UFC / g de suelo sería la concentración de bacterias final en suelo tras fertilizar con el fertilizante recubierto y suponiendo una supervivencia de 1 de cada 35 bacterias y, finalmente,  $10^5$  UFC / g de suelo concentración más elevada y la máxima que por razones técnicas podría alcanzarse en el caldo inoculante con el que se recubrirá el abono. Estos datos se obtuvieron suponiendo que la relación inoculante/abono fuese de 0,5 %, la dosis de abonado 50 Kg / ha y la profundidad del suelo donde se distribuyen los microorganismos fuese 2 cm.

En los resultados de producción de biomasa no existieron diferencias significativas para las concentraciones estudiadas. Sin embargo los valores numéricos indican superioridad de cualquier concentración frente al testigo sin inocular. Las concentraciones intermedias  $10^3$  y  $10^4$  UFC / g de suelo son las que proporcionan valores más elevados para todos los parámetros.

En cuanto a los resultados obtenidos con respecto al contenido en nutrientes de la planta y a la dosis de rizobios inoculados, se repite que la concentración de  $10^3$  UFC / g de suelo presenta los mayores niveles de porcentaje de N y de contenido total de N por planta. Cabe destacar la novedad de este estudio porque no existen, en no leguminosas, datos esclarecedores que evalúen el efecto de los microorganismos sobre el contenido en nutrientes en función de la dosis de microorganismos aplicada.

Aunque no cabe comparación posible tanto por el cambio de unidades como por el distinto efecto de los rizobios, existen estudios que han comprobado que dosis entre  $10^4$  y  $10^7$  *Rhizobium* / semilla, producen incrementos en los rendimientos en las cosechas en comparación con los tratamientos sin inocular. En concreto en estudios en soja, se ha obtenido el máximo de producción en el siguiente rango de dosis  $10^5$  –  $10^6$  *Rhizobium* / semilla (Albareda *et al.* 2009). De manera general, en estos estudios se observa que no siempre una mayor concentración de microorganismos repercute en un mayor efecto en la planta.

### 5.3.2 Producción de biomasa y rendimiento

Durante siglos se han cultivado simultánea o alternativamente cereales y leguminosas para incrementar la riqueza nutritiva del suelo, lo que ha provocado que las bacterias del género *Rhizobium* hayan desarrollado la capacidad de asociarse con las raíces de plantas no leguminosas (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero. 2001). Los primeros estudios llevados a cabo con bacterias del género *Rhizobium* en trigo demostraron que gran parte del trigo inoculado fue colonizado a través de las raíces laterales emergentes (Webster *et al.* 1997).

## Discusión

En esta asociación *Rhizobium*-cereal se ha demostrado que las bacterias son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante acciones PGPR directas e indirectas (Mehboob *et al.* 2009). A diferencia de otras especies PGPR, los rizobios producen la liberación de exopolisacáridos que recientemente se ha demostrado que mejoran tanto la colonización de las raíces, como la capacidad de mantener niveles óptimos de nutrientes y agua para la planta (Hussain *et al.* 2014).

En el ensayo realizado con trigo en suelo estéril (Apartado 4.1.2), se ha evaluado el efecto de la aplicación de la cepa de *Rhizobium leguminosarum* B4 y una cepa de *Burkholderia* sp. En un primer lugar, se ha demostrado que existen diferencias significativas en cuanto a la biomasa fresca y seca. El tratamiento fertilizante recubierto con la cepa de *Rhizobium* ha superado al control fertilizado sin inocular y al tratamiento con esta cepa aplicada directamente a la semilla utilizando turba como soporte. Sin embargo tratamientos como el fertilizante recubierto con *Burkholderia*, y con *Rhizobium* y *Burkholderia* combinadas, han presentado peores resultados que el tratamiento fertilizado sin inocular. Este resultado se puede entender porque en la inoculación mixta de *Rhizobium* y *Burkholderia*, la *Burkholderia* presenta mayores habilidades competitivas, siendo mucho más agresiva en la colonización del cereal, tal como se ha demostrado para el arroz (Singh *et al.* 2009), por lo tanto es posible que en nuestro estudio el potencial de estimulación del crecimiento que ha presentado la cepa de *Rhizobium* individualmente, se vea inhibido cuando se inocula con *Burkholderia*.

En el ensayo en trigo en suelo real en microcosmos en invernadero (Apartado 4.1.3), la producción de biomasa aérea en peso seco del tratamiento con el fertilizante recubierto de *Rhizobium* superó un 28,5 % al control fertilizado. Estos resultados concuerdan con el ensayo también con *Rhizobium* en trigo en el cual no utilizaron fertilizante, pero sí obtuvieron resultados positivos para los tratamientos inoculados en cuanto al peso seco de la parte aérea (Mehboob *et al.* 2011).

En los dos fertilizantes analizados en el ensayo de trigo, existen resultados que muestran que la utilización del microorganismo junto con el fertilizante, tiene efectos sinérgicos. Tan solo la mezcla de microorganismos parece anular el efecto sinérgico microorganismo – fertilizante, en el caso del fertilizante 15-35-0+Zn (7,5 UFN/ha y 17,5 UFP/ha), aunque no en el NAC 27 % (13,5 UFN/ha y 0 UFP/ha) en aplicación localizada en la línea de siembra. Este resultado es coherente con la bibliografía, que indica la necesidad de optimizar las mezclas de microorganismos para elaborar los cócteles, pues unas mezclas son sinérgicas (Figueiredo *et al.* 2007; Dardanelli *et al.* 2008, Weyens *et al.* 2009, Malusá *et al.* 2012, Dodd y Ruiz-Lozano. 2012) y otras debilitan el efecto individual (Felici *et al.* 2008; Francini *et al.* 2013).



En el ensayo de selección de bacterias en cebada en suelo real (Apartado 4.3.1), se analizó la producción de biomasa aérea en una maceta por bloque en el estadio G, final del ahijado (Keller y Baggiolini. 1954). En este caso se realizó una inoculación directa en las semillas sin utilizar abono y los resultados obtenidos fueron que todas las cepas de rizobios y las combinaciones seleccionadas superaron en peso seco al control sin inocular. Estos resultados coinciden con los obtenidos en ensayos de cebada con *Bacillus* spp. (Canbolat *et al.* 2006, Ahemad y Kibret 2014) y también con los resultados obtenidos con *Rhizobium* en cebada (Humphry *et al.* 2007, Mehboob *et al.* 2009).

En el muestreo de cebada al final del ciclo productivo se ha analizado el rendimiento en microcosmos, existiendo diferencias significativas entre tratamientos, tres de los tratamientos presentaron un rendimiento significativamente superior al control, en concreto fueron tres cepas de *Rhizobium leguminosarum* A7, C4 y D7. Existen diferentes estudios que corroboran la influencia de la inoculación de las distintas PGPR en el incremento productivo en la cosecha con *Pseudomonas fluorescens* y *Chryseobacterium balustinum* en arroz (Lucas *et al.* 2009), *Pseudomonas* spp. en maíz (Shaharoon *et al.* 2006), *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum* en cebada (Mirshekari *et al.* 2012), y en caso concretos de *Rhizobium leguminosarum* en arroz (Yanni y Dazzo. 2010).

### **5.3.3 Contenido en nutrientes**

En este trabajo, se ha analizado el contenido en nutrientes de la biomasa aérea en plantas de trigo y cebada, en ensayos realizados en microcosmos. En el ensayo de trigo los microorganismos fueron aplicados recubriendo el fertilizante 15-35-0 + Zn y el análisis se realizó a los 70 días después de la siembra, en el estadio de pleno ahijado (Estadio F) (Keller y Baggiolini. 1954). Sin embargo en el caso del ensayo de cebada, los microorganismos fueron inoculados directamente en la semilla aplicándose el abonado para cubrir las extracciones del cultivo de forma independiente; en este caso, el análisis del contenido de nutrientes se realizó a los 75 días después de la siembra al final del ahijado (Estadio G) (Keller y Baggiolini. 1954).

#### **5.3.3.1 El nitrógeno**

La fertilización con nitrógeno en las plantas, especialmente en los cereales, es crítica para potenciar el rendimiento en las cosechas; por esta razón el nitrógeno es un elemento clave, muy demandado y que no puede almacenarse en las raíces. Cuando las necesidades en nitrógeno no se suplen o no son las óptimas para el desarrollo vegetal, el crecimiento se ve retardado. El nitrógeno debería ser aportado a intervalos cortos de tiempo, mientras otros elementos se pueden aplicar en el momento de la siembra. Existe una relación entre la producción de materia

## Discusión

seca y la absorción total de N en cereales en variedades diferentes y en distintos ambientes (Baset *et al.* 2010).

El ciclo del nitrógeno tiene un gran impacto en la fertilidad del suelo debido a que es un nutriente esencial y bioquímicamente complejo (Jetten. 2008, Adesemoye y Kloepper. 2009). Este ciclo está controlado por cuatro procesos microbianos: la fijación de nitrógeno, la nitrificación, la desnitrificación y la mineralización del nitrógeno (Ogunsietan. 2005). Por lo tanto los microorganismos han demostrado tener un papel muy importante en el ciclo y en la utilización del nitrógeno de los fertilizantes en el sistema planta-suelo (Adesemoye *et al.* 2010).

Las necesidades de nitrógeno del trigo son, como promedio, 30 kg / 1000 kg de grano producido, aunque pueden variar entre 28 a 40 kg. La dosis de fertilizante y el fraccionamiento dependen del crecimiento del trigo y el rendimiento esperado, las condiciones como densidad de plantas y las características de la variedad y las técnicas de cultivo. La dosis global de nitrógeno utilizada varía entre 120 y 200 kg de N / ha. Las mayores necesidades de nitrógeno del trigo se producen en el período comprendido entre el ahijamiento y el encañado (García-Serrano *et al.* 2010).

En el **ensayo de trigo en suelo real** se ha utilizado un suelo franco, de pH básico (9,36), un contenido de materia orgánica medio-alto 1,74 %, con baja disponibilidad de fósforo Olsen (11,98 mg/kg), debido al valor del pH y al alto contenido en caliza del suelo. Se evaluó el fertilizante 15-35-0 + Zn con los microorganismos y el NAC 27 %, ambos fertilizantes a una dosis de 50 kg / ha.

Los resultados (Apartado 4.1.3) muestran cómo la inoculación de la cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* en el fertilizante 15-35-0 + Zn (F-R) incrementa la concentración de nitrógeno en planta un 6 % sobre el control fertilizado sin inocular, aunque estas diferencias no fueron significativas. Estos resultados corroboran los obtenidos en la inoculación de *Rhizobium leguminosarum* en lechuga (*Lactuca sativa*) y zanahoria (*Daucus carota*) que han demostrado que la inoculación incrementa el contenido en N de la parte comestible de ambos vegetales (Flores-Félix *et al.* 2013).

A pesar de que el fertilizante NAC 27 % aporta 1,8 veces más nitrógeno que el 15-35-0 + Zn, en el análisis de los nutrientes en la biomasa se observa que el NAC 27 % presenta los valores más bajos de concentración de nutrientes, incluido el nitrógeno. Este resultado se explica con los datos de biomasa fresca y seca obtenidos, en los cuales los tratamientos con NAC presentan los resultados más elevados, lo que parece indicar que se produce el típico efecto de dilución (Caram *et al.* 2007). La superioridad de biomasa obtenida con el fertilizante NAC 27 % se debe probablemente al mayor aporte de N, ya que la dosis de fertilizante fue la misma y su riqueza

mayor. Además en el NAC 27 %, el 13,5 % del N se encuentra en forma nítrica, rápidamente asimilable mientras que en el 15-35-0 + Zn tan sólo el 2 %.

La cebada extrae del suelo un promedio de 25 kg de N / 1000 kg de grano producido y la dosis óptima varía entre 80 y 140 kg de N / ha, dependiendo del clima y del suelo. En la cebada se recomienda una primera aplicación de fertilizante con la siembra y una segunda aportación entre el ahijado y el encañado (García-Serrano *et al.* 2010).

En el ensayo de selección de bacterias en **cebada en suelo real** se ha utilizado un suelo franco-arcilloso, de pH básico 8,69, un contenido de materia orgánica de 1,54 % y un mayor contenido de fósforo que en el ensayo de trigo (20,5 mg / kg).

En este ensayo, los tratamientos con microorganismos han mejorado en todos los casos la concentración de nitrógeno en las plantas de cebada, el contenido total de N en la planta y el desarrollo vegetativo (en peso seco de la biomasa aérea) con respecto al control, de manera individual y en combinaciones (Apartado 4.3.1). Estos resultados concuerdan con diferentes estudios que demuestran que la inoculación con microorganismos incrementa el contenido en nutrientes de las plantas (Egamberdiyeva. 2007, Singh. 2011, Dawwam *et al.* 2013).

De manera similar a lo que sucedía en el ensayo de trigo, los tratamientos que estimulan en mayor medida el desarrollo vegetal presentan una menor concentración de nutrientes en planta.

La cepa C4 de *Rhizobium leguminosarum* (seleccionada por producir IAA y sideróforos) incrementa en un 15 % la concentración de N presente en la biomasa con respecto al control sin microorganismos. Esto supone que, a pesar de que las plantas tratadas con dicha cepa no presentan una producción de biomasa significativamente superior a la del testigo, el contenido de nitrógeno total por planta es de los más altos, superando en un 40 % al del testigo sin inocular. Por el contrario la cepa A7 de *Rhizobium leguminosarum* (seleccionada por presentar la mayor actividad ACC desaminasa) produce un incremento muy pequeño de la concentración de N en la biomasa, pero fue la que más estimuló el crecimiento de la planta, de manera que el valor absoluto del N total por planta fue el más elevado. Estos datos concuerdan con los obtenidos en ensayos con *Rhizobium leguminosarum* en cebada en los cuales también se incrementa el contenido en N en la biomasa de la planta (Lupwayi *et al.* 2004).

Aunque las dos combinaciones de rizobios mejoran al tratamiento control en biomasa fresca y seca, nitrógeno en porcentaje y nitrógeno total, no superan al efecto de las cepas de rizobios utilizadas de manera individual. Estos datos contrastan con los obtenidos en trigo y en cebada, en los cuales se mezclaron *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* y *Azospirillum brasilense* y la mezcla

superó en el contenido de nutrientes de la biomasa a los microorganismos utilizados de manera individual (Baris *et al.* 2014)

La nutrición nitrogenada de las plantas, no sólo se realiza a partir del N mineral, sino que también se realiza a partir del N orgánico, aunque en bajas cantidades. Se ha demostrado en dos especies vegetales (*Hakea actites* y *Arabidopsis thaliana*), que ambas son capaces de utilizar las proteínas como fuente de N (Paungfoo-Lonhienne *et al.* 2008). Aunque los exudados radiculares producen enzimas proteolíticas las plantas también absorben proteínas intactas de manera más ocasional vía endocitosis. Esto es debido a que la mayor parte de los aminoácidos en la solución del suelo no se encuentran libres, sino formando parte de péptidos pequeños (Hill *et al.* 2013). Además los microorganismos también pueden ser considerados alimento para las plantas (Paungfoo-Lonhienne *et al.* 2010), aunque recientemente se ha observado que los microorganismos tienen una habilidad mucho mayor para utilizar el N orgánico que las plantas (Schmidt *et al.* 2014). En el ensayo que estudia el nivel de colonización de raíz por los rizobios, llevados a cabo en esta tesis (Apartado 4.5) se ha demostrado que la colonización de las raíces de cebada se ha producido a nivel rizosférico y no endofítico, por lo tanto no se ha considerado que el incremento del contenido en nitrógeno de la biomasa sea debido al consumo de los microorganismos.

En cuanto al ensayo de dosis de microorganismos en cebada en suelo real (Resultados apartado 4.4) las dosis intermedias de microorganismos  $10^3$  y  $10^4$  UFC / g de suelo respectivamente ( $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  UFC / maceta con 5 plantas de cebada), son las que mejores resultados presentan en cuanto a nitrógeno total por planta, y no la dosis más elevada de microorganismos como se podría esperar si dichos microorganismos fueran utilizados como fuente de nutrientes. Recientemente, se ha demostrado que la tasa de N procedente de los microorganismos es muy baja en comparación con el N absorbido comúnmente por las plantas en formas más simples en el suelo (Hill *et al.* 2013).

### **5.3.3.2 El fósforo**

El fósforo en los cereales mejora la precocidad y favorece el desarrollo radicular, teniendo un papel esencial en la formación de la espiga y del grano (Sharma *et al.* 2013). Debido a la fijación de este nutriente en el suelo y al incremento de los costes de los fertilizantes fosfatados se están desarrollando técnicas para incrementar la eficacia en el uso del fósforo. Entre ellas se encuentran reutilizar el fósforo no asimilable del suelo, la utilización de fósforo orgánico (proveniente de bioproductos y subproductos), la modificación de las formulaciones de los fertilizantes (por ejemplo formulaciones líquidas) y de los métodos de aplicación; también se está avanzando en la interacción en la química del suelo y la incorporación de microorganismos solubilizadores de fosfato (Mc. Laughlin *et al.* 2011, Withers *et al.* 2014).

El efecto beneficioso de las bacterias solubilizadoras de fosfato o BSP, viene determinado por la capacidad de solubilizar fósforo mineral (fosfato dicálcico, tricálcico, hidroxiapatito y roca fosfórica). Esta capacidad está relacionada con la producción de ácidos orgánicos, principalmente a partir de la oxidación de la glucosa (como el ácido glucónico, 2-cetoglucónico, láctico, cítrico, tartárico, etc) y la producción de ácidos inorgánicos (como por ejemplo el ácido clorhídrico HCl y el sulfhídrico H<sub>2</sub>S). Además las plantas también poseen mecanismos de acidificación del suelo como la producción de H<sup>+</sup> originado tras la asimilación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Sharma *et al.* 2013). Por otra parte, la capacidad de solubilización del fósforo orgánico o mineralización viene determinada por la producción de enzimas fosfatasas y fitasas (Baniaghil *et al.* 2013).

Desde hace años se conoce la capacidad de solubilización de fósforo mineral en *Rhizobium*, en 1996 se demostró que *Rhizobium leguminosarum* era capaz de estimular el crecimiento, debido esta propiedad PGP tanto en maíz como en lechuga (Chabot *et al.* 1996).

La cepa B4 solubilizadora de fosfato mineral ha sido evaluada en ensayos de trigo y de cebada. En el caso del trigo, es un cultivo más exigente nutricionalmente y además ha sido evaluado en un suelo pobre en fósforo. Mientras que la cebada es un cultivo con menores requerimientos nutricionales y se ha evaluado en un suelo rico en nutrientes.

En el ensayo de **trigo** en microcosmos en invernadero, se utilizaron dos tipos de fertilizantes el 15-35-0 + Zn y el NAC 27 % en un suelo de pH básico (9,36), bajo en fósforo asimilable (11,98 mg/kg) y con un alto contenido en calcio (20,51 cmol (+)/kg). Se ha observado un efecto positivo en la concentración de fósforo cuando se ha inoculado con la cepa B4 (Apartado 4.1.3). En este caso los mejores resultados obtenidos en concentración de fósforo en la planta a los 70 días de la siembra, fueron con el fertilizante 15-35-0 + Zn y en la semilla recubierta con la cepa B4.

En el ensayo de selección de bacterias en **cebada**, el suelo utilizado fue un suelo con un alto contenido en fósforo asimilable (20,5 mg/kg), con un pH básico (8,68) pero menor que en el anterior. En este caso (Apartado 4.3), no se ha observado un efecto positivo sobre la concentración de fósforo en las plantas de la cepa solubilizadora de fosfato ni de ninguna cepa inoculada, probablemente debido a que no se han dado condiciones limitantes de fósforo en el desarrollo de la cebada.

Sin embargo, las extracciones fueron mayores en todos los tratamientos con cepas inoculadas, correspondiéndose con la mayor producción de biomasa. Estos resultados obtenidos en ambos cereales coinciden con el observado con una cepa de *Mesorhizobium mediterraneum* que estimula el crecimiento y el contenido de fósforo en plantas de cebada incluso en condiciones no limitantes de fosforo (Peix *et al.* 2001).

## Discusión

En el análisis de los contenidos residuales de nutrientes en el suelo tras el ensayo de cebada, el parámetro con mayores diferencias observadas fue el contenido de fósforo. Respecto al testigo, tanto la cepa B4 como la A7, muestran contenidos residuales más elevados de fósforo fácilmente asimilable (Olsen). La cepa B4 ha sido positiva a la prueba de solubilización de fosfato inorgánico *in Vitro* y deja menos fósforo residual que la cepa A7 que presentó un resultado negativo en esta prueba de solubilización de P. Esto podría ser debido a que la cepa A7 produce fosfatasas o fitasas y moviliza el fosforo orgánico del suelo, puede que la cepa B4 consuma el fosforo movilizado o podría ser debido a mecanismos aún desconocidos de movilización de fósforo.

En este sentido, en la solubilización de fósforo mineral, la enorme cantidad de rutas metabólicas generadoras de ácidos por las bacterias han hecho imposible el desarrollo de un conocimiento unificado sobre la microbiología de la solubilización de fosfato. De hecho, existen investigadores que sugieren que los ácidos orgánicos producidos por las bacterias solubilizadoras de fosfato no son determinantes en la solubilización del fósforo mineral y el único factor determinante es la concentración de H<sup>+</sup> originados en la respiración o asimilación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Sharma *et al.* 2013). No obstante, varios estudios han confirmado que la inoculación con PGPR incrementa el contenido en P en la biomasa aérea (Dawwam *et al.* 2013, Machado *et al.* 2013), incluso con *Rhizobium* en no leguminosas (Baset y Shamsuddin. 2010).

### 5.3.3.3 Otros nutrientes

En la biomasa aérea de las plantas de trigo y cebada también se ha analizado el contenido en K, Ca y Mg.

En el caso del **trigo** se observa un incremento en la concentración de K en los tratamientos inoculados con la cepa B4 de *Rhizobium* sobre el control sin inocular, esto mismo ocurre para el Mg y para el Ca. Este incremento de la concentración, combinado con un incremento de la biomasa total como consecuencia de la estimulación del crecimiento repercute en el contenido total de éstos nutrientes. Cabe recordar que el análisis de suelo de este ensayo ha presentado un contenido alto de Ca (20,51 cmol/kg), medio de K (0,42 cmol/kg) y bajo de Mg (1,28 cmol/kg).

Sin embargo, en el caso de la **cebada**, la nutrición fue adecuada porque el suelo contenía suficiente cantidad de nutrientes y las bacterias no presentaron una ventaja competitiva, de manera que la concentración de estos nutrientes en planta en los tratamientos inoculados no presentó mejoría frente al control sin inocular. En concreto, el contenido de nutrientes del suelo utilizado fue alto en Ca (27,07 cmol/kg), medio-alto en K (0,66 cmol/kg) y alto en Mg (2,93 cmol/kg), por lo tanto en el ensayo no se establecieron condiciones limitantes de estos nutrientes en el suelo. No obstante, se ha observado un incremento en el contenido total de los nutrientes en las plantas de cebada (Apartado 4.3.1), que como ya hemos comentado en el caso del trigo, pudo ser debido a la capacidad de estimulación del crecimiento de los microorganismos superando en todos los casos al testigo sin inocular. Estos resultados concuerdan con los aportados por la bibliografía.

En el caso del potasio, existen bacterias solubilizadoras de potasio capaces de liberarlo a la solución del suelo desde formas minerales insolubles (Sugumaran y Janarthanam. 2007, Basak y Biswas. 2012, Kalaiselvi y Anthoniraj. 2009, Parmar y Sindhu. 2013, Prajapati *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2013, Gundala *et al.* 2013, Archana *et al.* 2012, Archana *et al.* 2013, Sindhu *et al.* 2012). Los mecanismos para la solubilización son la bajada del pH o acidificación y la estimulación de la formación de quelatos con los cationes con los que se encuentra unido el potasio. Estos mecanismos son llevados a cabo mediante la producción de ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos, de manera que libera el potasio mineral insoluble incrementando la biodisponibilidad de este nutriente para las plantas (Singh *et al.* 2014).

Múltiples estudios han demostrado cómo las PGPR producen un incremento del contenido de nutrientes en diferentes especies vegetales, como un aumento de K en maíz en la inoculación con *Pseudomonas* y *Bacillus* (Egamberdiyeva. 2007), también se produce incremento con *Rhizobium* en arroz (Yanni *et al.* 2001, Mishra *et al.* 2008). Posteriormente se ha analizado el contenido en K, Ca y Mg en arroz, trigo y maíz en plantas inoculadas con *Rhizobium*, y se ha

observado que se favorece la absorción de estos nutrientes por las plantas (Mehboob *et al.* 2009). Además, en el caso concreto del arroz, también se ha observado un incremento en el contenido de Zn y el Mo provocado por *Rhizobium* (Yanni y Dazzo. 2010). Recientes estudios han demostrado que la inoculación con rizobacterias incrementa la absorción de otros oligoelementos Fe, Cu, Mn, además del Zn y Mo en diferentes cultivos (Rana *et al.* 2012, Bhattacharyya y Jha. 2012).

Probablemente, en un análisis del contenido en nutrientes del grano se observaría un incremento en los tratamientos con microorganismos, como se observó en el estudio realizado en trigo, con incrementos entre 28-60 % (Rana *et al.* 2012). Lo mismo ocurre en girasol, se ha demostrado que la inoculación con PGPR incrementa la cantidad y la calidad de la cosecha debido a que se produce un aumento en el contenido en nutrientes (Akbari *et al.* 2011). Además recientemente, se ha observado que la inoculación con dos cepas PGPR también incrementa el contenido en clorofila de las hojas junto con la mejora del valor nutritivo del grano aumentando el contenido en proteína soluble y disminuyendo el contenido en carbohidratos (Stefan *et al.* 2013).

### **5.4 Interacción entre rizobios y raíz**

Hoy en día se conocen sistemas de comunicación y señalización altamente especializados que se llevan a cabo entre organismos que se desarrollan en la rizosfera, producto de un proceso co-evolutivo. Estos sistemas regulan una gran cantidad de procesos biológicos que van desde el control de los ciclos biogeoquímicos hasta las rutas más complejas del metabolismo de las plantas (Megias *et al.* 2011). El punto de partida para el estudio de dichas interacciones es el conocimiento del nivel de colonización de la planta por los microorganismos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la asociación entre el rizobio y las raíces del cereal se produce a nivel rizosférico. Este resultado contrasta con los estudios que demuestran que la asociación entre *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* y plantas de arroz es endofítica y no rizosférica (Yanni *et al.* 2001, Yanni y Dazzo. 2010). Además, se ha demostrado que los rizobios actúan como endófitos en cebada, maíz y colza mejorando la nutrición, observándose incrementos de nitrógeno en la biomasa aérea y en la cosecha (Lupwayi *et al.* 2004). En el proceso de infección de *Rhizobium* en plantas de arroz, se producen cambios estructurales en los pelos radicales laterales y desde aquí se extienden a través de la raíz de la planta (Perrine-Walker *et al.* 2007).

Este trabajo ha demostrado que es posible la transformación de bacterias del género *Rhizobium* con la sonda *Green Fluorescent Protein* o GFP (Apartado 4.4.1). El proceso se ha llevado a cabo



mediante conjugación biparental en medio sólido empleando la cepa S17.1 de *E. coli* como donadora. Aunque se había demostrado posible dicha transformación en otras cepas del género *Rhizobium*, debido a la variabilidad intraespecífica existente se hace necesario comprobarlo en cada cepa (Baymiev *et al.* 2011).

Mediante esta técnica diferentes investigadores han examinado la infección, diseminación y colonización de los tejidos sanos de plantas de arroz por cuatro especies de rizobios marcados con GFP y han examinado su influencia en el crecimiento del arroz, demostrando que dicha colonización es a nivel endofítico y que además favorece el crecimiento de las plantas (Chi *et al.* 2005). Concretamente, la entrada de los rizobios endófitos se produce a través de la punta de la raíz, por grietas laterales o en el punto de emergencia de las raíces secundarias, heridas en la epidermis o por daño en los estomas (James *et al.* 2002, Chi *et al.* 2005, Perrie-walker *et al.* 2007).

Después de la entrada, *Rhizobium* se disemina a través de los tejidos de la planta huésped evitando las respuestas defensivas de la planta, la zona del córtex de la raíz es la región inicial de colonización (Verma *et al.* 2004). La colonización se produce a través de los espacios intracelulares del córtex de la raíz hacia los vasos del xilema (Roncato-Maccari *et al.* 2003).

Seguidamente las bacterias se propagan hasta la siguiente generación a través de las semillas o por medios vegetativos (Verma *et al.* 2001) y colonizan tallos y hojas (Perrie-Walker *et al.* 2007). En semillas de arroz esterilizadas, se han aislado de su interior bacterias del género *Bacillus* (Okunishi *et al.* 2005) y Misaghi y Donndelinger (1990) detectaron colonizadores endofíticos en el interior de los ovarios y frutos de algunas plantas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la interacción entre rizobio-cereal se produce a nivel rizosférico en condiciones de esterilidad. Sin embargo, puede que en otras condiciones como en suelo real esta interacción sea diferente. Varios estudios muestran que existen diversos factores que tienen influencia en que *Rhizobium* se comporte o no como endófito. Entre ellos se encuentran el contenido en nitrógeno del suelo (Muthukumarasamy *et al.* 1999, Muthukumarasamy *et al.* 2002), el tipo de suelo (Oliveira *et al.* 2006) el estado de desarrollo de la planta huésped y la variedad (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado. 2003, Oliveira *et al.* 2006).

No obstante, cuando los rizobios actúan como endófitos y se encuentran en las hojas, son capaces de crecer hasta concentraciones de  $10^{10}$  bacterias /  $\text{cm}^3$  en puntos localizados de los tejidos de plantas de arroz, y se ha comprobado que a partir de la inoculación con  $5 \times 10^7$  células pasados 15 días en plantas de arroz en condiciones gnotobióticas, se pudieron observar entre  $10^3 - 10^5$  UFC / g de peso fresco de la base del tallo (Chi *et al.* 2005). En algunas regiones de las

raíces de arroz colonizado se han observado zonas engrosadas debido al alto número de células de *Rhizobium trifolii* marcadas con GFP (Perrine-Walker *et al.* 2007, Bhattacharjee *et al.* 2008). En contraste con el funcionamiento de las interacciones planta-patógenos, en el caso de la interacción planta-PGPR se regulan los procesos de expresión de falsos receptores del etileno (Cavalcante *et al.* 2007). La respuesta ISR desarrollada en la colonización por un PGPR no altera el establecimiento de la interacción (Mirza *et al.* 2001).

En estudios más recientes en plantas de arroz, se ha analizado la capacidad endofítica de *Rhizobium sp.* frente a *Burkholderia sp.*, ambas marcadas genéticamente con el gen que codifica la GFP, concluyeron que la colonización de *Rhizobium sp.* fue inhibida en gran medida cuando se realizó una coinoculación con *Burkholderia sp.* (Singh *et al.* 2009).

En este trabajo se ha realizado una primera prueba de aislamiento de microorganismos de las raíces de cebada germinada en condiciones gnotobióticas y se observó que no existían bacterias endofíticas. Para descartar la posibilidad de que este resultado se deba a una esterilización muy agresiva de las raíces se realizaron pruebas posteriores en condiciones menos agresivas. En estas condiciones se aislaron otras bacterias, pero no rizobios, que se supusieron procedentes del interior de la semilla. Estos datos corroboran que las bacterias endofíticas pueden colonizar flores, frutos y semillas (Patel *et al.* 2012), pero ratifican el carácter rizosférico de la asociación entre las raíces de cebada y la cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum*.

### **5.5 Efecto de los fertilizantes mejorados con rizobios en campo**

Se ha demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) estimulan el crecimiento de la biomasa aérea y la producción de grano en la cosecha, particularmente cuando el contenido en nutrientes del suelo es bajo (Turán *et al.* 2012). Pero también la inoculación con bacterias aporta beneficio incluso en presencia de niveles óptimos de fertilización nitrogenada (Shaharoon *et al.* 2006). Incluso recientes estudios sugieren que la inoculación con PGPR puede ser usado con el mayor nivel de fertilización de nitrógeno y fósforo para incrementar el peso seco de la biomasa y el rendimiento (Mirshekari *et al.* 2012).

Los principales retos a los que se enfrenta la utilización de microorganismos rizosféricos, son las variaciones medioambientales, de cultivar, suelo y microflora original de la zona de cultivo. Por lo tanto, la selección de cepas eficientes de rizobia para cultivos específicos es un aspecto crítico para incrementar el rendimiento en la cosecha (Mehboob *et al.* 2011).

### 5.5.1 Ensayo de cebada variedad *Publican* (Beja, Portugal)

En el ensayo realizado en cebada variedad *Publican* en Beja, tan sólo se obtuvieron diferencias significativas para el parámetro, peso seco del grano (Apartado 4.5.1 Tabla 65). Las producciones de cebada obtenidas se encuentran entre 2900 - 3800 Kg / ha. En este caso, el suelo de Beja Portugal, presentó un elevado porcentaje de arena, una gran cantidad de P disponible para las plantas 34 mg / kg (Olsen) y bajo contenido en K 0,41 cmol / kg. En este caso el abonado seleccionado que fue recubierto de la capa de microorganismos fue NPK 12-24-12.

En el ensayo de Beja, ningún tratamiento fertilizado al 80 % mejoró al Control Fertilizado al 100 % en rendimiento. Esto podría ser debido a que la Fertilización al 80 % no cubre el 100 % de las extracciones de nutrientes del cultivo, mientras que sí son cubiertas con el Fertilizante 100 %, y por lo tanto mejora el rendimiento.

Después del control fertilizado al 100 % los mejores resultados en rendimiento corresponden al fertilizante al 80 % recubierto de la cepa D7 (seleccionada como segunda productora de ácido indolacético). En el caso del tratamiento Fertilizado al 80 % con la cepa B4 supera al Control Fertilizado al 80 % un 12 % en rendimiento en la cosecha, a pesar de que el contenido de fósforo del suelo en el ensayo en Beja fue alto. Posiblemente su efecto no tiene que ver con la movilización del fósforo, sino en la estimulación del crecimiento, coincidiendo con los resultados de Peix *et al.* (2001) que ha demostrado que una cepa de *Mesorhizobium mediterraneum* solubilizadora de P, estimula el crecimiento y el contenido de fósforo en plantas de cebada incluso en condiciones no limitantes, cuando se adicionó al suelo fosfato tricálcico.

La combinación de microorganismos no produjo mejora respecto a los microorganismos individuales. Estos resultados contrastan con los obtenidos en trigo y en cebada mediante la inoculación de tres PGPR (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium* y *Azospirillum brasilense*), en este estudio se ha demostrado que la mezcla de microorganismos ha presentado mejora en el rendimiento en grano y la producción de paja, con respecto a las cepas utilizadas de manera individual (Baris *et al.* 2014).

### 5.5.2 Ensayo de trigo variedad *Core* (Berengenilla, Sevilla)

En el caso del trigo de la variedad *Core*, las producciones varían entre 3500 – 4600 Kg/ha y no existieron diferencias significativas. El suelo de la parcela Berengenilla fue franco-arcilloso con un pH básico, bastante rico en K (1,29 cmol/kg), muy pobre en P (6,82 mg/kg) y con elevado contenido de Ca (36,21 cmol/kg), lo cual dificulta la disponibilidad del P. La fertilización de fondo utilizada fue DAP 18-46-0 (Fosfato Diamónico).

Los tratamientos que mejores resultados han presentado (Apartado 4.5.1 Tabla 66), han sido los tratamientos fertilizados al 80 % recubiertos respectivamente con la cepa C4 (seleccionada por su capacidad de producir fitohormonas, ácido indolacético) y con B4 (solubilizadora de fosfato mineral). Estos resultados que muestran incrementos de producción debido a la inoculación con microorganismos concuerdan con la bibliografía descrita para el trigo variedad Avispa y podría explicarse por la producción de fitohormonas como el IAA descrito como el principal mecanismo de promoción del crecimiento en plantas debido a que estimula el crecimiento de raíces y pelos radicales, aumentando su densidad y mejorando así la absorción de nutrientes (Machado *et al.* 2013).

En este caso, las combinaciones de microorganismos, aun a pesar de mejorar los resultados con respecto al control sin fertilizar y a los dos controles fertilizados al 80 % y al 100 %, no superan a las cepas de *Rhizobium* utilizadas de manera individual.

### **5.5.3 Ensayo de trigo variedad Avispa (Rancho Paulo, Sevilla)**

El trigo de la variedad *Avispa* se cultivó en Rancho Paulo y los rendimientos obtenidos se encuentran entre 1300 – 2200 Kg/ha, existiendo diferencias significativas para todos los parámetros excepto para el peso específico (Apartado 4.5.1 Tabla 67). El suelo utilizado fue franco-arcilloso con un pH básico, bastante rico en K (1,17 cmol/kg), muy pobre en P (6,87 mg/kg) y con elevado contenido de Ca (34,64 cmol/kg), lo cual dificulta la disponibilidad del P. La fertilización de fondo utilizada fue DAP 18-46 (Fosfato Diamónico).

El tratamiento que mejores resultados ha presentado ha sido el tratamiento fertilizado al 80 % con la cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* (solubilizadora de fosfatos minerales). Éstos datos concuerdan con diversos estudios de *Rhizobium* que demuestran que incrementa la producción de cereal (Baset y Shamsuddin. 2010, Mehboob *et al.* 2011, Akhtar *et al.* 2013). Con la cepa B4 se obtienen buenos resultados en cuanto a parámetros de calidad del grano además de mejorar la eficiencia del cultivo en el índice de cosecha. Nezarat y Gholami (2009) demostraron que la inoculación con otras PGPR como *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* en maíz, se produce un incremento en el número de mazorcas y un incremento en el peso de los granos. Recientemente se ha demostrado que además *Pseudomonas syringae* y *P. fluorescens* producen incremento en la longitud de las mazorcas, incremento en el número de filas por mazorca y otros parámetros que derivan en un incremento de la producción de grano de un 55 % (Zafar-ul-Hye *et al.* 2014).

Resulta llamativo que el Control Fertilizado al 100 % presente resultados menores al Control Fertilizando al 80 %. Esto podría ser debido a la Ley de rendimientos decrecientes o Ley de

Mistscherlich que concluye que a medida que se aumentan las dosis de un elemento fertilizante disminuye el incremento del rendimiento por unidad fertilizante suministrada, hasta llegar un momento en el que los rendimientos no sólo no aumentan sino que disminuyen (García-Serrano *et al.* 2010). Se ha demostrado que, a niveles óptimos de fertilización nitrogenada, la inoculación con rizobacterias puede ser efectiva para mejorar el crecimiento de las plantas (Shaharoon *et al.* 2006). En dicho trabajo, la inoculación con PGPR ha sido efectiva a todos los niveles de fertilización con N, P y K, pero el efecto positivo de las bacterias decrece según aumentan los niveles de fertilización. Por consiguiente, las PGPR deben ser utilizadas a óptimas dosis óptimas para conseguir el máximo beneficio (Shaharoon *et al.* 2008).

En cuanto a las combinaciones de cepas, han presentado mejores resultados que el control abonado al 100 % y sin abonar, sin embargo han presentado valores de rendimiento menores que casi todas las cepas utilizadas de manera independiente. Estos resultados contrastan con los obtenidos en coinoculaciones de PGPR como en el caso de la inoculación con *Bacillus* que incrementa un 24 % la producción de trigo de manera individual, mientras que combinado con *Azospirillum* el incremento de la cosecha asciende hasta un 33 % (Turan *et al.* 2012). Lo mismo ocurre cuando se inocula *Bacillus* que solo incrementa un 7 % el rendimiento en la cosecha contra un 17,5 % cuando se coinocula *Bacillus* con *Rhizobium* (Akhtar *et al.* 2013). Aunque cabe destacar que en ambos estudios citados anteriormente se han coinoculado especies de géneros diferentes, mientras que en nuestros ensayos de campo se han coinoculado dos cepas de *Rhizobium leguminosarum* diferentes, por lo tanto el efecto de incremento de la producción en la coinoculación podría ser mayor al combinar géneros diferentes.

#### **5.5.4 Ensayo de trigo variedad *Artur Nick* (Algarabejo, Sevilla)**

En el caso del trigo de la variedad *Artur Nick*, cultivado en Algarabejo, los rendimientos de campo se encuentran entre 3300 y 4600 Kg/ha. El suelo en Algarabejo, presentó un contenido medio de materia orgánica 1,08 % y un contenido bajo en P (9,16 mg/kg).

En este ensayo, existieron diferencias significativas para el rendimiento o peso del grano, para el peso seco del grano y de la paja (Apartado 4.5.1 Tabla 68). Además, todos los tratamientos recubiertos con microorganismos superaron a los tres testigos utilizados, incluido el fertilizado al 100 %.

La cepa que mejores resultados presentó fue la A7, seleccionada porque presentó actividad ACC desaminasa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en maíz, en los cuales se ha demostrado que la inoculación con PGPR (*Pseudomonas thivervalensis* y *Serratia marcesens*)

con actividad ACC desaminasa, mejora el crecimiento de las plantas y el rendimiento en la cosecha cuando se utiliza junto con una adecuada fertilización (Shahzad *et al.* 2013).

Las cepas utilizadas de manera individual han presentado mejores resultados que las combinaciones de cepas, a diferencia de lo que ocurre en estudios realizados en otras especies vegetales como en arroz, tomate, pimiento y pepino (Kumar *et al.* 2009, Latha *et al.* 2009 y Jetiyanon *et al.* 2003).

### **5.5.5 Análisis conjunto ensayos de cámara, microcosmos y campo**

Tanto si el efecto en la estimulación del crecimiento y en el incremento de la producción de dichos tratamientos, es debido a la producción de fitohormonas, a la solubilización del fosforo mineral, a la actividad ACC desaminasa o a un conjunto de acciones, no cabe ninguna duda de que las cepas seleccionadas de la especie *Rhizobium leguminosarum* son capaces de incrementar la biomasa aérea, el peso seco de la paja y el rendimiento en casi todos los casos superando al testigo sin fertilizar, al testigo fertilizado al 80 %, el testigo fertilizado al 100 % o incluso a ambos testigos fertilizados como ocurre en el trigo *Core* y *Artur Nick*.

La cepa B4 (seleccionada por su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico) fue evaluada en cámara de cultivo y en microcosmos con plantas de trigo, en ambos casos presentó un incremento del peso seco de la biomasa aérea con respecto al control sin inocular. En los ensayos de campo, fue la cepa que presentó mejores rendimientos y más constantes en los cuatro ensayos, con una media de incremento del rendimiento del 6,8 % si se compara con el testigo fertilizado al 80 %.

En los suelos de los ensayos de trigo *Core* y *Avispa* se han detectado valores muy bajos de fósforo disponible (Olsen) en los análisis de suelo. Esto concuerda con el hecho que la cepa seleccionada por su capacidad de solubilización de fosfato mineral B4 presentara los mejores resultados en el caso del trigo *Avispa* y los segundos mejores resultados en el caso del trigo *Core*. Recientes estudios han demostrado como la capacidad de solubilización de fosfato por las bacterias de la rizosfera constituye un factor clave en el desarrollo de las plantas, en la producción y en el contenido en nutrientes en arroz (Bayuelo-Jiménez y Ochoa-Cadavid. 2014, Lavakush *et al.* 2014).

La cepa A7 (seleccionada por presentar actividad ACC desaminasa) fue analizada en cebada y fue la que mejores resultados presentó incrementando tanto la biomasa aérea como el contenido de nitrógeno total en las plantas. Respecto a los ensayos de campo, ha presentado incrementos de rendimiento muy discretos (1,8 - 2,5 %) en los ensayos, excepto en el caso del trigo *Artur Nick* que el incremento de producción ascendió al 13,4 %.

Sin embargo, la cepa C4 (productora de la fitohormona IAA y de sideróforos) en microcosmos fue la cepa que produjo el mayor incremento en la concentración de nitrógeno de la biomasa de las plantas de cebada y en contenido total de nitrógeno en la planta presentó buenos resultados. Esta cepa, en campo no ha tenido efecto en el rendimiento en cebada, mientras que en el trigo ha producido unos incrementos de rendimiento del 6,7 % de media y en el trigo *Core* ha sido la cepa que mayor rendimiento produjo.

La D7 (productora de IAA) no destacó especialmente en invernadero, aunque ha producido mejoras del peso seco, la concentración y del contenido total de nitrógeno de las plantas de cebada. El efecto en campo ha sido de incrementos de rendimiento de más del 13 % en cebada y menores del 4 % en trigo.

Por lo tanto a modo de resumen, la cepa B4 ha sido la que mejores resultados ha tenido tanto en trigo como en cebada en el rendimiento en grano. La A7 presentó incrementos de producción discretos excepto con el trigo *Artur Nick*, que ha destacado con un gran incremento de la producción. En cuanto a la cepa C4 parece ser buena en trigo y no en cebada, al contrario de la cepa D7 que ha sido excepcionalmente buena en cebada. Sin embargo, las combinaciones de microorganismos rara vez mejoraban a las cepas utilizadas de manera individual, por lo tanto no es recomendable la mezcla de cepas de *Rhizobium* para este tipo de ensayos.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos en otros cereales, por ejemplo en maíz se produce una mejora en el crecimiento y en la producción de grano cuando se inoculan combinados *Rhizobium tropici* y *Bradyrhizobium diazoefficiens*, lo cual podría ser debido a los efectos combinados de la producción de exopolisacáridos (EPSs), de hormonas y de lipoquitooligosacáridos (LCOs) (Marks *et al.* 2003). También contrasta con el estudio realizado en trigo y en cebada, en el cual se combinaron *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* y *Azospirillum brasilense* y combinados presentaron mejores resultados en la producción de paja y de grano que cuando se utilizaron de manera individual (Baris *et al.* 2014).

## **5.6 Estudio económico y ambiental de las soluciones propuestas.**

En las próximas décadas, el reto crucial de la humanidad será suplir la demanda de alimento sin destruir la integridad del medio ambiente y se harán necesarios cambios en el manejo de los nutrientes y del agua (Mueller *et al.* 2012). En este panorama, los retos que corresponden a los PGPR van enfocados a mejorar los cultivos haciéndolos más eficaces en la asimilación de nutrientes minerales y más resistentes a condiciones de estrés por sequías, salinidad y contaminantes orgánicos e inorgánicos (Shaharoon *et al.* 2008, Malusá *et al.* 2012). Pero además, estos microorganismos deberán hacer frente a variaciones ambientales y climáticas,

## Discusión

variaciones de las plantas (variedad, estado vegetativo, exudados radicales,...), del suelo (pH, contenido en nutrientes,...), variaciones en las prácticas agrarias (utilización fungicidas y herbicidas) y deberán competir con la microflora indígena de la zona específica (Mehboob *et al.* 2011, Poonam y Khanna. 2011, Chaparro *et al.* 2012).

En estos momentos, la utilización de microorganismos junto con los fertilizantes químicos se está haciendo cada vez más popular, para mejorar la cosecha de los cultivos y el mantenimiento de la nutrición de las plantas de una manera integrada (Hayat *et al.* 2010).

En los ensayos de cereal en campo realizados en este trabajo se han evaluado los tratamientos microbianos con el 80 % de la fertilización recomendada para los ensayos y se incluyó el testigo fertilizado al 100 %. En dichos ensayos, 3 cepas mejoraron el testigo fertilizado al 80 % en 3 de 4 ensayos en campo. Además la cepa B4 funciona bien en todos los ensayos de campo, aunque no existen diferencias significativas. De manera global, los tratamientos microbianos mejoran la producción un 5,5 % sobre el control fertilizado al 80 % con su consecuente repercusión económica de un incremento del margen bruto de 39,1 € / ha.

En los ensayos de campo en los que las condiciones agroambientales fueron favorables, el incremento del margen bruto para el agricultor debido a la utilización de fertilizantes con tratamientos microbianos varían de 63,3 € / ha hasta 127,2 € / ha, y a su vez el incremento del rendimiento económico / UFT se situó entre 0,33 a 0,62. Mientras que en el ensayo con limitaciones agroambientales, tan sólo la cepa B4 presenta un incremento de la producción que supondría 30,2 € / ha con un incremento de rendimiento / UFT de 0,12. Estos datos coinciden con estudios que demuestran que la inoculación es efectiva en trigo a todos los niveles de fertilización con N, P y K, teniendo en cuenta que el efecto positivo decrece según aumentan los niveles de fertilización. Por lo tanto, las PGPR deben ser utilizadas a dosis óptimas para conseguir el máximo beneficio (Shaharoon *et al.* 2008). Sin embargo, recientes investigaciones han demostrado cómo diferentes PGPR obtienen mejores resultados cuando se utilizan con la máxima dosis de fertilizante (Mirshekari *et al.* 2012, Zafar-ul-Hye *et al.* 2014).

La utilización de rizobios en los fertilizantes de fondo para cereal ha provocado un incremento la eficiencia en términos de producción. Estos datos coinciden con evidencias de que el efecto de la inoculación con rizobios en arroz se ve fortalecido, más que suprimido, con la aplicación de fertilizantes minerales debido a que se incrementa la absorción por la planta de los nutrientes aportados, aumentando así la eficiencia en el uso de los mismos (Yanni y Dazzo. 2010).

La preocupación de la eficiencia energética en los sistemas agrarios ha ido ligada a los precios de la energía. Los estudios más recientes destacan como la agricultura cerealista de secano depende intensamente del consumo de energías no renovables. Los fertilizantes minerales son



esenciales para soportar rendimientos óptimos que son necesarios para satisfacer las crecientes necesidades de alimentos, forraje y bio-energía, y suponen el 55 % del total del consumo de energías no renovables, seguido del gasoil 35 %, los fitosanitarios 8 % y la maquinaria 2 % (Altuna *et al.* 2011).

Existen estándares internacionales para medir la huella de carbono y la huella de carbono en el campo se puede expresar por hectárea de cultivo o bien por tonelada de producto final. La huella de carbono en los cereales varía en función del tipo de agricultura más o menos intensiva, y en función del tipo de suelo cultivado: secanos semiáridos, frescos, intermedios, medios y regadíos. Existen investigaciones que han situado la tasa de emisiones de cereal en 202 kg CO<sub>2</sub> eq / t (Eady *et al.* 2011).

Los ensayos de campo en este trabajo demuestran que la utilización de rizobios en trigo y cebada provoca una disminución de la huella de carbono de dichos cultivos, debido a un aumento del rendimiento por superficie. En el ensayo de cebada *Publican*, la media de disminución de la huella de carbono fue de 10,2 kg CO<sub>2</sub> eq / t, en el ensayo de trigo *Core* de 4 kg CO<sub>2</sub> eq / t y en el ensayo de trigo *Arthur Nick* de 5,5 kg CO<sub>2</sub> eq / t. Los mejores tratamientos disminuyeron en 14 kg CO<sub>2</sub> eq / t en la cebada *Publican* y el trigo *Arthur Nick*, y en el caso del trigo *Core* en 7 kg CO<sub>2</sub> eq / t. En el ensayo de trigo *Avispa*, sólo la cepa B4 disminuyera la huella de carbono en 19 kg CO<sub>2</sub> eq / t en comparación con el tratamiento fertilizado sin microorganismos debido a que las condiciones agroclimáticas fueron bastante desfavorables.

En investigaciones agronómicas de la huella de carbono en cultivos de trigo, se ha demostrado que el uso de fungicidas ha llevado a disminuir las emisiones de 386 a 327 kg CO<sub>2</sub> eq / t (Berry *et al.* 2008). Sin embargo, no existen hasta el momento investigaciones con la utilización de PGPR y su influencia en la disminución de las emisiones de gases efecto invernadero, aunque si existen avances en la mejora de la tecnología de producción de fertilizantes y las mejores prácticas agrícolas permitiendo una significativa reducción de la Huella de Carbono en la producción de cultivos. Gran parte de las emisiones de gases efecto invernadero en la producción de cereal se deben a la fertilización nitrogenada y las pérdidas de N por volatilización, nitrificación y desnitrificación (Hillier *et al.* 2009).

Existe un aspecto controvertido que es la consideración de la captura, secuestro o remoción de CO<sub>2</sub> que se produce en actividades y productos basados en la fotosíntesis, como es el caso de la agricultura. Incluso se ha demostrado que el trigo puede convertir más CO<sub>2</sub> a la atmósfera de lo que emite durante su producción mejorando las prácticas agrarias (Gan *et al.* 2014).

## Discusión

En algunos casos, dependiendo del tipo de suelo, podría ser aconsejable la utilización de fertilizantes con microorganismos también en los abonados de cobertera, realizando aplicaciones repetidas para obtener el máximo efecto (Higa y Parr. 2010).

En la utilización conjunta de microorganismos y fertilizantes, resulta importante tener en cuenta que el incremento de los fertilizantes químicos en los ecosistemas terrestres afecta a las plantas y también afecta a las comunidades microbianas del suelo. La respuesta de los microorganismos a aplicaciones repetidas de fertilizantes minerales varía de manera considerable dependiendo del ambiente y de otros factores relacionados con el mantenimiento del cultivo (Geisseler y Scow. 2014).

Estudios recientes muestran los resultados de metagenómica en ecosistemas sin cultivar observándose que la fertilización nitrogenada suprime el desarrollo de los microorganismos del suelo (Lu *et al.* 2011). No obstante, también en otros estudios con metagenómica la fertilización mineral provoca un incremento de la biomasa total del suelo en términos de C / kg de suelo de manera significativa, sobre un 9 % comparado con los controles sin fertilizar (Kallenbach y Grandy. 2011). Estos datos concuerdan con los obtenidos comparando el contenido en C orgánico en macetas con fertilización nitrogenada con macetas sin fertilizar, de manera que las macetas fertilizadas aumentaron el  $C_{org}$  en un 8 % de media. Este mismo análisis evaluó el efecto de la fertilización con NPK y el incremento del  $C_{org}$  ascendió a un 10 % en comparación con el control sin fertilizar (Körschens *et al.* 2013).

La fertilización realizada con urea y amonio de manera repetida durante años produce una acidificación o disminución del pH de 0,45 a 2,20 unidades en 8 y 25 años respectivamente, comparado con el control sin fertilizar, mientras que la aplicación de nitrato apenas tiene efecto sobre el pH (Guo *et al.* 2010). El amonio es la fuente de nitrógeno preferida por la mayoría de las bacterias y hongos del suelo, sin embargo niveles altos de urea y amonio provocan la inhibición de los microorganismos debido a la toxicidad del amonio, incrementos del pH e incremento de la fuerza iónica (Omar e Ismael. 1999).

Se ha demostrado que las aportaciones de fertilizante nitrogenado no presentan efectos sobre la comunidad bacteriana del suelo de manera consistente (Ramirez *et al.* 2010). En el caso de aplicaciones repetidas de nitrato cálcico, se ha demostrado que tiene muy poco efecto sobre bacterias y hongos, sin embargo cuando se aplica sulfato amónico dichas poblaciones se ven reducidas de manera significativa (Börjesson *et al.* 2012).

No obstante, la composición de la comunidad bacteriana no presenta diferencias significativas entre suelos sin fertilizar y suelos tratados con fertilizantes minerales (Börjesson *et al.* 2012). Esto se explica debido a que las aportaciones de nitrógeno por sí mismas no producen un efecto

negativo sobre los microorganismos en suelos agrícolas. Sin embargo, cuando la fertilización nitrogenada disminuye el pH, la actividad y la composición de las comunidades microbianas se ve claramente afectada. Tanto en suelos sin cultivar como en suelos cultivados, el pH parece tener un fuerte efecto en las comunidades microbianas del suelo. A largo plazo, los efectos de la fertilización nitrogenada tienden a tener un mayor número de efectos positivos que negativos sobre los microorganismos que son capaces de oxidar el amonio y otros microorganismos nitrificantes (Geisseler y Scow. 2014).

Los grupos de microorganismos de la rizosfera presentan diferentes respuestas dependiendo de factores como las condiciones ambientales y el manejo del cultivo; por lo tanto se hace difícil entender las interacciones entre factores ambientales, tipos y niveles de fertilización y grupos específicos de microorganismos (Geisseler y Scow. 2014). Sin embargo, no cabe duda de que la incorporación de microorganismos con los fertilizantes incrementa la microbiota del suelo, que repercute positivamente en la transformación de nutrientes en formas solubles o biodisponibles (N, P, S, Ca, Fe, Mn, Zn,...), mejora la fijación y transformación del N, favorece la degradación de la materia orgánica y los residuos agroquímicos, se mejora la estructura del suelo, se establece una fuente de metabolitos bioquímicos, se incrementa la biomasa total y se favorece la supresión de microorganismos patógenos (Castro Pinto. 2011).

Los avances en las técnicas biotecnológicas de mejora de la eficiencia agronómica, producen claros incrementos en las producciones de los cultivos, sin embargo dicho conocimiento agronómico se debe unir con el medioambiental para ayudar a gestionar los ecosistemas agrarios y finalmente, con el conocimiento de los agricultores (Doré *et al.* 2011).



## **6 Conclusiones**



- La cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* es capaz de soportar las condiciones generadas en el proceso de disolución del gránulo de fertilizante. Se ha demostrado la supervivencia del inóculo en el suelo mediante recuento en placa y el Número más Probable.
- La cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* muestra una tendencia clara a mejorar la eficiencia de la fertilización a nivel de microcosmos cuando se aplica recubriendo al fertilizante mineral, dando lugar a una mayor producción de biomasa o extracción de nutrientes que el testigo fertilizado sin inocular.
- Resultados pruebas PGPR *In vitro*:
  - Las cepas que dieron positivo a la prueba de solubilización de fosfato  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  fueron la B4 y la B3.
  - Todas las cepas estudiadas fueron capaces de producir Ácido indolacético IAA, aunque destacaron la C4, D7 y C3.
  - Las cepas productoras de sideróforos fueron A13; C4; C2 y C3.
  - Las bacterias que presentaron actividad ACC desaminasa fueron A7, A11 y E2.
- En el ensayo de cebada para la evaluación del efecto de los microorganismos seleccionados por sus propiedades PGP, todas las cepas seleccionadas han incrementado el peso seco de la biomasa aérea, la concentración de nitrógeno de la biomasa y el contenido total de nitrógeno por planta en comparación con el testigo sin inocular.
- Las dosis de microorganismos aplicadas al suelo que mejores resultados dan de biomasa producida y contenido en nutrientes son las dosis de  $10^4$  y  $10^5$  UFC/g de suelo. Dosis superiores o inferiores a estas empeoran los resultados.
- En los estadios iniciales de desarrollo de las plántulas de cebada, en condiciones de esterilidad la colonización por la cepa B4 de *Rhizobium leguminosarum* se produce a nivel rizosférico.
- Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* presentan una tendencia clara a mejorar la eficiencia de la fertilización en campo cuando se aplican recubriendo al fertilizante mineral, dando lugar a mayores rendimientos y aumentando la producción de biomasa en comparación con el testigo fertilizado sin inocular. El tratamiento que ha presentado una mayor constancia en los resultados de rendimiento, ha sido la cepa B4.
- Las cepas inoculadas de forma individual sobre el abono producen mejores efectos que cuando se aplican combinadas entre sí.

## Conclusiones

- En cuanto al análisis económico se ha demostrado que la utilización de los fertilizantes mejorados repercute en una ganancia de entre 63 y 127 €/ ha debido a un incremento en la eficiencia del cultivo del cereal.
- Finalmente en la evaluación ambiental se ha comprobado que la utilización de rizobios en los fertilizantes minerales reduce entre 7 y 19 kg de CO<sub>2</sub> eq /ha la huella de carbono en los ensayos realizados.



## **7 Bibliografía**



- Abd-Alla, M.H. 1994.** Use of organic phosphorous by *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 8: 216-218.
- Adesemoye, A.O. H.A.Torbert y J.W.Kloepper. 2010.** Increased plant up take of nitrogen from 15 N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* 46: 54-58.
- Adesemoye, A.O. y J.W. Kloepper. 2009.** Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1-12.
- Adesemoye, A.O., H.A. Torbert y J.W. Kloepper. 2008.** Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 876-886.
- Aguado-Santacruz, G.A., B. Moreno-Gómez, B. Jiménez-Francisco, E. García-Moya y R.E. Preciado-Ortiz. 2012.** Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 1: 9-21.
- Ahemad, M. y A. Malik. 2011.** Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Journal of Bacteriology* 2: 12-21.
- Ahemad, M. y M. Kibret. 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University* 26: 1, 1–20.
- Ahemad, M. y M.S. Khan. 2010.** Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide-stress. *Annals of Microbiology* 62: 1531-1540.
- Ahemad, M. y M.S. Khan. 2011a.** Ecotoxicological assessment of pesticides towards the plant growth promoting activities of Lentil (*Lens esculentus*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRL3. *Ecotoxicology* 20: 661-669.
- Ahemad, M. y M.S. Khan. 2011b.** Plant growth promoting fungicide tolerant *Rhizobium* improves growth and symbiotic characteristics of lentil (*Lens esculentus*) in fungicide applied soil. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 334-342.
- Ahemad, M. y M.S. Khan. 2012a.** Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRP1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 334-343.
- Ahemad, M. y M.S. Khan. 2012b.** Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram *Vigna radiata* (L.) using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 4: 451-459.
- Ahmad, F., I. Ahmad y M.S. Khan. 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163, 2: 173-181.
- Ahmad, N., S.B. Javed, M. Khan y M. Anis. 2013.** Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Vitex trifolia*: an important medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 2493-2500.
- Ahmed, E. y S. J. M. Holmström. 2014.** Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7, 3: 196-208.
- Ahuja I., R. Kissen y A.M. Bones. 2012.** Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17: 73-90.

## Bibliografía

- Akbari, P., A. Ghalavand, A.M. Modares Sanavy, M. AghaAlikhani y S. Shoghi. 2011.** Comparison of different nutritional levels and the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the grain yield and quality of sunflower. *Australian Journal of crop science* 5, 12: 1570-1576.
- Akhtar, N., I. Arshad, M.A. Shakir, M.A. Qureshi, J. Sehrish y L. Ali. 2013.** Co-inoculation with *Rhizobium* and *Bacillus* sp. To improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Animal and Plant Sciences* 23: 1.
- Alamri, S.A. Y.S. Mostafa. 2009.** Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 16, 2: 101-107.
- Albareda, M., D.N. Rodríguez-Navarro y F.J. Temprano. 2009.** Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. *Field Crops Research* 113: 352-356.
- Albareda, M., D.N. Rodríguez-Navarro, M. Camacho, F.J. Temprano. 2008.** Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 11: 2771-2779.
- Alcantar González, G., G. Cruz, D. Flores, A. TrinidadA. Bautista. 2007.** Actividad fosfatasa y el pH del suelo adyacente a la rizosfera de maíz, trigo y triticale en suelos ácidos. *Terra latinoamericana* 2 115-125.
- Alcántar, G. y L.I. Trejo-Téllez. 2011.** Nutrición de Cultivos. Universidad Autónoma de Chapingo. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34: 3.
- Alexander, D.B. y D.A. Zuberer. 1991.** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12: 39-45.
- Altuna, A., A. Lafarga, O. Hierro, O. Unamunzaga y G. Besga. 2014.** Huella de carbono de los cereales. Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias INTIA.36.
- Ambardar, S. y J. Vakhlu. 2013.** Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 2271-2279.
- Antoun, H., C.J. Beauchamp, N. Goussard, R. Chabot y R. Lalonde. 1998.** Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204: 57-67.
- Archana, D.S., M.S. Nandish, V.P. Savalagi y A.R. Alagawadi. 2012.** Screening of potassium solubilizing bacteria (KSB) for plant growth promotional activity. *Bioinfolet* 9, 4: 627-30.
- Archana, D.S., M.S. Nandish, V.P. Savalagi y A.R. Alagawadi. 2013.** Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *Bioinfolet* 10: 248-57.
- Armenta-Bojórquez, A.D., G.A. Baca-Castillo y G. Alcántar-González. 2001.** Nitrate and potassium ratios in a drip fertirrigation system on production, quality and nutrient uptake in tomato. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 7, 1: 61-75.
- Armghan, I.M., M. Asif, H. Arvind y G. Aakash. 2013.** Growing wheat on saline lands: Can a dream come true? *Australian Journal of Crop Science* 7: 4.
- Arora, N.K., E. Khare y D.K. Maheshwari. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. *In: D.K. Maheshwari (Ed) Plant growth and health promoting bacteria. Microbiology monographs vol. 18. pp. 97-116, Springer Berlin. Alemania.*

- Arora, N.K., R.E. Khare, R. Naraian y D.K. Maheshwari. 2008.** Sawdust as a superior carrier for production of multipurpose bioinoculant using plant growth promoting rhizobial and pseudomonad strains and their impact on productivity of *Trifolium repense*. *Current Science* 1: 90-95.
- Arshad, M., M. Saleem y S. Hussain. 2008.** Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology* 25: 356-362.
- Babalola, O.O. 2010.** Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32: 1559-1570.
- Badr, K. R. Müller, H. Schäfer-Pregl, S. El Rabey, H. Effgen, H. Ibrahim, C. Pozzi, W. Rohde, y F. Salamini. 2000.** On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 17, 4: 499-510.
- Bakker, P.A., C.M. Pieterse y L.C. van Loon. 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology Journal* 97: 239-243.
- Banayo, N.P.M., P.C. Cruz, E.A. Aguilar, R.B. Badayos y S.M. Haefele. 2012.** Evaluation of biofertilizers in irrigated rice: effects on grain yield at different fertilizer rates. *Agriculture* 2: 73-86.
- Baniaghil, N., M.H. Arzanesh, M.Ghorbanli y M. Shahbazi. 2013.** The effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, antioxidant enzymes and microelements of canola under salt stress. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 3, 1: 17-27.
- Bard, A.K., Müller, R. Schäfer-Pregl, H. El Rabey, S. Effgen, H. Ibrahim, C. Pozzi, W. Rohde, y F. Salamini. 2000.** On the Origin and domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 17, 4: 499-510.
- Bard, K.A., M. Coltorti, M.C. DiBlasi, F. Dramis y R. Fattovich. 2000.** The Environmental History of Tigray (Northern Ethiopia) in the Middle and Late Holocene: A Preliminary Outline. *African Archaeological Review* 17: 2.
- Barea, J.M., R. Azcón y C. Azcón-Aguilar. 2005.** Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. 195-212. *In: F. Buscot, S. Varma (Eds). Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Heidelberg. Alemania.*
- Baris, O., F. Sahin, M. Turan, F. Orhan y M. Gulluce. 2014.** Use of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Seed Inoculation as Alternative Fertilizer Inputs in Wheat and Barley Production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 45: 18, 2457-2467.
- Barnawal, D., N. Bharti, D. Maji, C.S. Chanotiya y A. Kalra. 2012.** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 227-235.
- Basak, B.B., D.R. Biswas. 2012.** Modification of waste mica for alternative source of potassium: evaluation of potassium release in soil from waste mica treated with potassium solubilizing bacteria (KSB). Germany: Lambert Academic Publishing. Alemania.
- Baset, M.A. y Z.H. Shamsuddin. 2010.** *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. *African Journal of Biotechnology* 9, 37: 6001-6009.
- Baset, M.A., Z.H. Shamsuddin, Z. Wahab, y M. Marziah. 2010.** Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacterial (PGPR) Inoculation on Growth and Nitrogen Incorporation of Tissue-cultured 'Musa' Plantlets under Nitrogen-free Hydroponics Condition. *Australian Journal of Crop Sciences* 4: 2, 85-90.

## Bibliografía

- Bashan, Y., G. Holguin, y L.E. De-Bashan. 2004.** Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521-577.
- Basharat, A. A.N. Sabri y S. Hasnain. 2010.** Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 1379-1384.
- Baymiev, A.K., R.S. Yamidanov, R.T. Matniyazov, D.K. Blagova, A.K. Baymiev, y A.V. Chemeris. 2011.** Preparation of Fluorescent Labeled Nodule Bacteria Strains of Wild Legumes for Their Detection *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Biology* 45, 6: 904-910.
- Bayuelo-Jiménez, J.S. e I. Ochoa-Cadavid. 2014.** Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency among maize landraces from the central Mexican highlands. *Field Crops Research* 156: 123-134.
- Beck, D.P., L.A. Materon y F. Afandi. 1993.** Practical Rhizobium-Legume technology manual. Technical Manual. 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria.
- Beckers, G.J.M. y S.H. Spoel. 2006.** Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Journal of Plant Biology* 8: 1-10.
- Bedmar, E.J., J. González, C. Lluch, y B. Rodelas. 2006.** Fijación de nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones, SEFIN, Granada, España.
- Behera, B.C., S.K.Singdevsachan, R.R.Mishra, S.K.Dutta y H.N.Thatoi. 2013.** Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- 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.
- Berg, G. y K. Smalla. 2009.** Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 1-13.
- Beringer, J.E. 1974.** R factors transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198.
- Berquó, B., M. Megías, M. Antonio Nogueira y M. Hungria. 2013.** Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express* 3: 21.
- Berry, P.M., D.R. Kindred y N.D. Paveley. 2008.** Quantifying the effects of fungicides and disease resistance on greenhouse gas emissions associated with wheat production. *Plant Pathology* 57, 1000-1008.
- Bertani, G. 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.
- Bhattacharjee, R.B., A. Singh y S. N. Mukhopadhyay. 2008.** Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 199-209.
- Bhattacharjee, R.B., P. Jourand, C. Chaintreuil, B. Dreyfus, A. Singh y S.N. Mukhopadhyay. 2012.** Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote

- rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. *Biology and Fertility of Soils* 48, 2: 173-182.
- Bhattacharyya, P. y D. Jha. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1-24.
- Biswas, J.C., J.K. Ladha y F.B. Dazzo. 2000a.** Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake and Growth of Lowland Rice. *Soil Science Society of America Journal* 64: 1644-1650.
- Biswas, J.C., J.K. Ladha, F.B. Dazzo, Y.G. Yanni y B.G. Rolfe. 2000b.** Rhizobial Inoculation Influences Seedling Vigor and Yield of Rice. *Agronomy Journal* 92: 880-886
- Bloemberg, G.V. y B.J.J. Lugtenberg. 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 343-350.
- Börjesson, G., L. Menichetti, H. Kirchmann y T. Kätterer. 2012.** Soil microbial community structure affected by 53 years of nitrogen fertilization and different organic amendments. *Biology and Fertility of Soils* 48: 245-257.
- Bothmer, R.V., N. Jacobsen, C. Baden, R. Jorgensen y I. Linde-Lauren. 1995.** An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. 2<sup>nd</sup> Ed. International Plant Genetic Resources Institute. FAO. Rome.
- Boukhalfa, H. y A.L. Crumbliss. 2002.** Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biomaterials* 15: 325-391.
- Braud, A., M. Hannauer, G.L.A. Milsin, y I.J. Schalk. 2009.** The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology* 191: 5317-25.
- Burns, R.G., J.L. Forest, J. Marxsen, R.L. Sinsabaugh, M.E. Stromberger, M.D. Wallenstein, M.N. Weintraub y A. Zoppini. 2013.** Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future Directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58: 216-234.
- Canbolat, M.Y., S. Bilen, C.kmakc, R. Sahin y F. Aydin. 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.
- Caram, G.A., P. Angeloni y J. Prause. 2007.** Determination of the nitrogen dilution curve in different phenological phases of sunflower. *Agricultura Técnica*, 67, 2. Chile.
- Carrillo-Castaneda, G., J.J. Munoz, J.R. Peralta-Videa, E. Gomez y J.L. Gardea-Torresdey. 2003.** Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal of Plant Nutrition* 26: 1801-1814.
- Cassman, K.G., A. Dobermann y D.T. Walters. 2002.** Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Ambiociencias* 31: 132-140.
- Castro Pinto, J. 2011.** Mejora de la eficiencia de los abonos minerales mediante la incorporación de microorganismos beneficiosos. 10<sup>a</sup> Reunión Buena. Albacete, España.
- Cavalcante J.J.V., C. Vargas, E.M. Nogueira, F. Vinagre, K. Schwarcz, J.I. Baldani, P.C.G. Ferreira y A.S. Hemerly. 2007.** Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *Journal of Experimental Botany* 58, 3: 673-686.

## Bibliografía

- Chabot, R., C.E. Beauchamp, J.W. Kloepper y H. Antoun. 1998.** Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1615-1618.
- Chabot, R., H. Antoun y M.P. Cescas. 1996.** Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant and Soil* 184: 311-321.
- Chaparro, M., A.M. Sheflin, D.K. Manter y J.M. Vivanco. 2012.** Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils* 48: 489-499.
- Charmet, G. 2011.** Wheat domestication: Lessons for the future. *Comptes Rendus Biologies* 334, 3: 212-220.
- Chen, W.C. Y. Kang, X. Li, X. Gu, Y. Song y P. Guo. 2013.** Effect of root exudates on pentachlorophenol adsorption by soil and its main chemical components. *International Journal of Environment and Pollution* 52, 1/2: 1-14.
- Cheng, H. y G.C. Walker. 1998.** Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 180, 19: 5183.
- Chi, F., S.H. Shen, H.P. Cheng, Y.X. Jing, Y.G. Yanni y F.B. Dazzo. 2005.** Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7271-7278.
- Chu, B.C., A. Garcia-Herrero, T.H. Johanson, K.D. Krewulak, C.K. Lau, R.S. Peacock, Z. Slavinskaya y H.J. Vogel. 2010.** Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601-611.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement y E.A. Barka. 2005.** Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 4951-4959.
- Contesto, C., C. Milesi, S. Mantelin, A. Zancarini, G. Desbrosses, F. Varoquaux, C. Bellini, M. Kowalczyk y B. Touraine. 2010.** The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of Arabidopsis to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* 232: 1455-1470.
- Curl, E.A., y B. Truelove. 1986.** The Rhizosphere. *Advanced Series in Agricultural Sciences*. 15: 288. Springer-Verlag. Berlin. Alemania.
- Dardanelli, M.S., F.J. Fernandez de Cordoba, M.R. Espuny, M.A.R. Carvajal, M.E.S. Diaz, A.M.G. Serrano, Y. Okon y M. Megias. 2008.** Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2713-2721.
- Davis, J.G. 1951.** Milk Testing. Dairy Industries Ltd, London. UK.
- Dawson, I.K., K.J. Chalmers, R. Waugh, y W. Powell. 1993.** Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. *Molecular Ecology* 2: 151-159.
- Dawwam, G.E., A. Elbeltagy, H.M. Emara, I.H. y M.M. Abbas. 2013.** Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Hassan Annals of Agricultural Science* 58, 2: 195-201.



- Daza, A., C. Santamaría, D.N. Rodríguez-Navarro, M. Camacho, R. Orive y F. Temprano. 2000.** Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 567-572.
- Dazzo, F.B., Y.G. Yanni, R. Rizk, F.J. Bruijn, J. Rademaker, A. Squartini, V. Corich, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, E. Velázquez, J.C. Biswas, R.J. Hernandez, J.K. Ladha, J. Hill, J. Weinman, B.G. Rolfe, M. Vega-Hernandez, J.J. Bradford, R.I. Hollingsworth, P. Ostrom, E. Marshall, T. Jain, G. Orgambide, S. Philip-Hollingsworth, E. Triplett, K.A. Malik, J. Maya-Flores, A. Hartmann, M. Umali-Garcia, y M.L. Izaguirre-Mayoral. 2000.** Progress in multinational collaborative studies on the beneficial association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice. 167-190. *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. Ladha J.K. y Reddy P.M. (Ed). Makati City. Filipinas.
- Deaker, R., J.R. Roughley, I.R. Kennedy. 2004.** Legume seed inoculation technology. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1275-1288.
- Debeaujon, I., L. Lepiniec, L. Pourcel y J.M. Routaboul. 2007.** Seed coat development and dormancy. *Seed Development, Dormancy and Germination*. 25-43. Eds Bradford K, Nonogaki H Blackwell, Oxford, UK.
- Dendy, D.A.V. y B.J. Dobraszczyk. 2003.** *Cereales y Productos Derivados*. (Ed.) Acribia. Madrid. España.
- Deshwal, V.K., P. Pandey, S.C. Kang, D.K. Maheshwari. 2003.** Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Experimental Biology* 41: 1160-1164.
- Diamond, J. 1998.** *Guns, germs and steel*. Vintage, London.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003.** Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22, 2: 107-149.
- Dobermann, A. y K.G. Cassman. 2005.** Cereal area, yield and nitrogen use efficiency are drivers for future nitrogen fertilizer consumption. In press *Science in China*. Vol. 48: 745-758. Lincoln. Nebraska. Estados Unidos.
- Dodd, I.C. y J.M. Ruiz-Lozano. 2012.** Microbial enhancement of crop resource use efficiency. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 236-242.
- Domínguez, A. 1989.** *Tratado de Fertilización*. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Doré, T., D. Makowski, E. Malézieux, N. Munier-Jolain, M. Tchamitchian, P. Tittonell. 2011.** Facing up to the paradigm of ecological intensification in agronomy: Revisiting methods, concepts and knowledge. *European Journal of Agronomy* 34: 197-210.
- Drewer, J., J.W. Finch, R.L. Colin., E.M. Baggs y U. Skiba. 2012.** How do soil emissions of N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> from perennial bioenergy crops differ from arable annual crops? *Bioenergy*, 4: 408-419.
- Duan, J., K.M. Müller, T.C. Charles, S. Vesely, y B.R. Glick. 2009.** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from Southern Saskatchewan. *Microbial Ecology* 57: 423-436.
- Dworkin, M. y J. Foster. 1958.** Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology* 75: 592-601.
- Eady, S., A. Carre y T Grant. 2012.** Life cycle assessment modelling of complex agricultural systems with multiple food and fibre co-products. *Journal of Cleaner Production*, 28: 143-149.

## Bibliografía

- Egamberdieva, D. 2008.** Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turkish Journal of Biology* 32, 1: 9-15.
- Egamberdiyeva, D. 2007.** The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied soil ecology* 36, 184-189.
- El-Howeity, M.A. y M.M. Asfour. 2012.** Response of some varieties of canola plant (*Brassica napus* L.) cultivated in a newly reclaimed desert to plant growth promoting rhizobacteria and mineral nitrogen fertilizer. *Annals of Agricultural Science* 57, 2: 129-136.
- Elsheikh, E.A. 1998.** Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Annals of Applied Biology* 132: 507-524.
- Ereikul, O. y W. Köhn. 2006.** Effect of Weather and Soil Conditions on Yield Components and Bread-Making Quality of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Winter Triticale (*Triticosecale* Wittm.) Varieties in North-East Germany. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192: 452-464.
- España. 1988.** Real Decreto 72/1988, de 5 de febrero, sobre fertilizantes y afines 4043-4045.
- España. 1997.** Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo 124.
- España. 2002.** Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal 40970-40988.
- España. 2005.** Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes, regula aspectos del Reglamento (CE) N° 2003/2003. 25592-25669.
- España. 2008.** Orden APA/863/2008 de 25 de marzo, sobre productos fertilizantes por la que se modifican los anexos I, II, III, y VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes 18145-18180.
- España. 2013.** Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes 51119- 51207.
- Espinosa, J. y P. García. 2009.** Nutrient Use Efficiency in the Context of Sustainable Agriculture. (Eds). Proceedings of the Symposium "Nutrient Use Efficiency" presented by the International Plant Nutrition Institute (IPNI) at the XVIII Latin American Congress of Soil Science. Costa Rica.
- Europa. 1991.** Directiva del Consejo 91/676/CEE, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias.
- Europa. 1991.** Reglamento Comunitario (CEE) N° 2092/91, de 24 de junio sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios L 198.
- Europa. 2002.** Reglamento N° 1774/2002 que contiene las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano L 273.
- Europa. 2003.** Reglamento (CE) N° 1784/2003 del Consejo de 29 de septiembre por el que se establece la organización común de mercados en el sector de los cereales L 270/78.
- Europa. 2003.** Reglamento (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a los abonos L 304/1.

- Europa. 2004.** Reglamento (CE) N° 2076/2004 se modifica por primera vez el anexo I, relativo a los abonos EDDHSA y superfosfato triple, se adapta por primera vez el anexo I del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Europa. 2007.** Reglamento (CE) N° 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM) 001-004.
- Europa. 2007.** Reglamento (CE) N° 162/2007 adaptación al progreso técnico los anexos I y IV sobre quelatos de hierro, agentes quelantes y corrección de métodos de análisis, del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Europa. 2008.** Reglamento (CE) N° 1107/2008 actualización de los mismos anexos pero en este caso el contenido de sulfato amónico, inhibidores de la nitrificación y de la ureasa, y corrección de la concentración de yodo en los método de análisis, del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Europa. 2009.** Reglamento (CE) N° 1020/2009 por el que se adaptan los anexos I, II, III y IV (sulfato de roca con magnesio, sulfato de magnesio con micronutrientes, analítica de nitrato amónico, actualización de métodos de análisis y requisitos para autorización de laboratorios de control, del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Europa. 2009.** Reglamento (CE) N° 1120/2009 del Consejo de 29 de octubre que establece disposiciones de aplicación del régimen de pago único previsto en el título III del Reglamento (CE) no 73/2009 del Consejo por el que se establecen disposiciones comunes aplicables a los regímenes de ayuda directa a los agricultores en el marco de la política agrícola común y se instauran determinados regímenes de ayuda a los agricultores L 316/1.
- Europa. 2010.** Reglamento (CE) N° 642/2010 del Consejo de 20 de julio por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 1234/2007 del Consejo en lo que concierne a los derechos de importación en el sector de los cereales L 187/5.
- Europa. 2011.** Reglamento (UE) N° 137/2011 por el que se adaptan los anexos I y IV, englobando las modificaciones de abonos con nutrientes esenciales, quelatos de micronutrientes y métodos validados de análisis, del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Europa. 2012.** Reglamento (UE) N° 223/2012 por el que se adaptan los anexos I y IV, actualiza en concreto las soluciones, las suspensiones y los abonos con mezclados con micronutrientes, del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Europa. 2013.** Reglamento (UE) N° 463/2013 por el que se adaptan los anexos I, II y IV, incluye modificaciones enmiendas calizas, fertilizantes calizos, ácido lignosulfónico y sal potásica, del Reg. (CE) N° 2003/2003 del Parlamento Europeo.
- Eurostat (Statistical Office of the European Communities). 2014:** European Commission. [http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/med\\_ag2](http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/med_ag2)
- FAO. 2010.** Towards ensuring food security in protracted crises: recommended actions. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [www.fao.org/docrep/013/i1683e/i1683e.pdf](http://www.fao.org/docrep/013/i1683e/i1683e.pdf). Roma. Italia.
- FAO. 2011.** The State of Food Insecurity in the World. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/014/i2330e/i2330e.pdf>. FAO Roma. Italia.

## Bibliografía

- FAO. 2013.** El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [www.fao.org/docrep/018/i3301s/i3301s.pdf](http://www.fao.org/docrep/018/i3301s/i3301s.pdf). FAO Roma. Italia.
- FAOSTAT. 2014.** Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Faoro, H., A. C. Alves, E. M. Souza, L. U. Rigo, L. M. Cruz, S. M. Al-Janabi, R. A. Monteiro, V. A. Baura y F. O. Pedrosa. 2010.** Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. *Applied and Environmental Microbiology* 4744-4749.
- Faris, J.D., Z. Zhang y S. Chao. 2014.** Map-based analysis of the tenacious glume gene Tg-B1 of wild emmer and its role in wheat domestication. *Gene* 542, 2: 198-208.
- Farzana, Y., O. Radziah, S. Kamaruza-man y M.S. Saad. 2009.** Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research* 3, 11: 815-821.
- Fedak, G. 1985.** Wide crosses in *Hordeum*. In: Barley. (Ed) D.C. Rasmusson. *Agronomy* 26: 155-186.
- Felici, C., L. Vettori, E. Giraldi, L.M.C. Forino, A. Toffanin, A.M. Tagliasacchi y M. Nuti. 2008.** Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*. 40, 2: 260-270.
- Fernandes, P.I., T.G. Rohr, P.J. de Oliveira, G.R. Xavier y N.G. Rumjanek. 2009.** Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44, 9: 1184-1190.
- Fertilizers Europe. 2014.** "Carbon Footprint Calculator for fertilizer products". B-1160 Bruselas Bélgica. <http://fertilizerseurope.com/index.php?id=137>.
- Fierer, N. y R. B. Jackson. 2006.** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences. Estados Unidos*. 103: 626-631.
- Fierer, N., M.A. Bradford y R.B. Jackson. 2007.** Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 6: 1354-1364.
- Figueiredo, M.V.B., H.A. Burity, C.R. Martinez y C.P. Chanway. 2007.** Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 1187-1193.
- Fliessbach, A; M. Winkler, M.P. Lutz, H.R. Oberholzer y P. Mader. 2009.** Soil Amendment with *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Lasting Effects on Soil Biological Properties in Soils Low in Microbial Biomass and Activity. *Microbial Ecology* 57, 4: 611-623.
- Flores-Félix, J.D., E. Menéndez, P.L. Rivera, M. Marcos-García, P. Martínez-Hidalgo, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, M.E. Velázquez, P. García-Fraile y R. Rivas. 2013.** Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176: 876-882.
- Foley, J.A., N. Ramankutty, K.A. Brauman, E.S. Cassidy, J.S. Gerber, M. Johnston, N.D. Mueller, C. O'Connell, D.K. Ray, P.C. West, C. Balzer, E.M. Bennett, S.R. Carpenter, J. Hill, C. Monfreda, S. Polasky, J. Rockstrom, J. Sheehan, S. Siebert, D. Tilman y D.P.M. Zaks. 2011.** Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342.

- Foley, J.A., R. Fries, G.P. Asner, C. Barford y G. Bonan, 2005.** Global Consequences of Land Use. *Science* 309: 570-574.
- França, M.A., C.R. Reges, M.V. Barreto, N.P. Stamford y G. Alves. 2013.** Feasibility of rhizobia conservation by liquid conditioners. Viabilidade da conservação de rizóbios por condicionadores líquidos. *Revista Ciencia Agronomica* 44, 4: 661-668.
- Frank, B. 1889.** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 7: 332-346.
- Franzini, V.I., A. Azcón, F.L. Méndes y R. Aroca. 2013.** Different interaction among *Glomus* and *Rhizobium* species on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays* plant growth, physiology and symbiotic development under moderate drought stress conditions. *Plant Growth Regulation* 70: 265-273.
- Fuller, D.Q. R.G. Allaby y C. Stevens. 2010.** Domestication as Innovation: The entanglement of techniques, technology and change in the domestication of cereal crops. In press. University of Warwick. Coventry. Reino Unido.
- Fuqua, W.C., S.C. Winans y E.P. Greenberg. 1994.** Quorum sensing in bacteria: the Lux R – Lux I family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176: 269-75.
- Gage, D.J. 2002.** Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 184: 7042-7046.
- Gage, D.J., T. Bobo y S.R. Long. 1996.** Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Bacteriology* 178: 7159-7166.
- Gamal-Eldin, H. y K. Elbanna. 2011.** Field evidence for the potential of *Rhodobacter capsulatus* as biofertilizer for flooded rice. *Current Microbiology* 62: 391-395.
- Gan, Y., C. Liang, Q. Chai, R.L. Lemke, C.A. Campbell y R.P. Zentner. 2014.** Improving farming practices reduces the carbon footprint of spring wheat production. *Nature Communications* 5: 5001.
- Gan, Y., C. Liang, X. Wang y B. McConkey. 2011.** Lowering carbon footprint of durum wheat by diversifying cropping systems. *Field Crops Research* 122, 199-206.
- Gao, B., X.T. Ju, Q. Zhang, P. Christie y F.S. Zhang. 2011.** New estimates of direct N<sub>2</sub>O emissions from Chinese croplands from 1980 to 2007 using localized emission factors. *Biogeosciences* 8, 4: 3011-3024.
- García-Fraile, P. 2008.** Identificación y caracterización de bacterias que nodulan *Phaseolus* en diferentes regiones en España. (Tesis Doctoral). Directores: Velázquez E. Rivas R. Departamento de Biología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.
- García-Fraile, P., D. Mulas-García, R. Rivas, F. Gonzalez-Andres, E. Velazquez. 2010.** *Phaseolus vulgaris* is nodulated in Northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Canadian Journal of Microbiology* 56, 8: 657-666.
- García-Fraile, P., L. Carro, M. Robledo, M.H. Ramírez-Bahena, J.D. Flores-Félix, M.T. Fernández, P.F. Mateos, R. Rivas, J.M. Igual, E. Martínez-Molina, Á. Peix y E. Velázquez. 2012.** *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One* 7, 5, e38122

## Bibliografía

- García-Serrano, P., S. Ruano, J.J. Lucena y M. Nogales. 2010.** Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Ministerio de Medio. 119 p. Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid. España.
- García-Villaraco, A., F.J. Gutiérrez, J.A. Lucas y B. Ramos. 2011.** Aplicaciones biotecnológicas de la interacción planta-microorganismo. 24: 361. In: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismo. (Eds): M. Megías, R. Rivilla, M.J. Soto, M.J. Delgado, E. González, P. Mateos, M. León, B. Rodelas y E.J. Bedmar. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- Gaye, R. 2006.** Novel Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Isolated From Western Australian Soils. (Tesis Doctoral). School of Biological Sciences and Biotechnology. Division of Science and Engineering. Murdoch University. Perth. Western Australia. Australia.
- Geisseler, D. y K.M. Scow. 2014.** Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms. Soil Biology and Biochemistry 75: 54-63.
- Germida, J.J. y S.D. Siciliano. 2001.** Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. Biology and Fertility of Soils 33: 410-415.
- Germida, J.J., S.D. Siciliano, J. Renato de Freitas, y A.M. Seib. 1998.** Diversity of root-associated bacteria associated with fieldgrown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) FEMS Microbiology Ecology 26: 43-50.
- Ghosh, P. y S. Kornfeld. 2004.** The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. European Journal of Cell Biology 83: 257-262.
- Glick, B.R. 2012.** Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. (Eds) T. Ano, G. Comi, y M. Shoda. Hindawi Publishing Corporation Scientica. 15. Department of Biology, University of Waterloo. Waterloo. Ontario. Canada
- Glick, B.R., C.N. Patten, G. Holguin y D.M. Penrose. 1999.** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promotion bacteria. 1-13. Imperial College Press London. Reino Unido.
- Glick, B.R., D.M. Karaturóvić y P.C. Newell. 1995.** A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads. Canadian Journal of Microbiology 41: 533-536.
- Glick, B.R., Z. Cheng, J. Czarny y J. Duan. 2007.** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. European Journal of Plant Pathology 119: 329-339.
- Gordon, S.A. y R.P. Weber 1951.** Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiology 26: 192-195.
- Govindarajan, M., J. Balandreau, S.W. Kwon, H.Y. Weon, y C. Lakshminarasimhan. 2007.** Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. Microbial Ecology 55: 21-37.
- Govindasamy, V., M. Senthilkumar, K. Gaikwad y K. Annapurna. 2008.** Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. Current Microbiology 57, 4: 312-317.
- Graner, G., P. Persson, J. Meijer, y S. Alstrom. 2003.** A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. FEMS Microbiology Letters 29: 269-276.

- Gruber, N. y J.N. Galloway. 2008.** An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451, 293-296.
- Grunberg, J., H. Nieberg y T.G. Schmidt. 2010.** Carbon footprint of food: a critical reflection. *Landbauforschung Volkenrode* 60: 53-72.
- Gundala, P.B., P. Chinthala y B. Sreenivasulu. 2013.** A new facultative alkaliphilic, potassium solubilizing, *Bacillus* sp. SVUNM9 isolated from mica cores of Nellore District, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2, 1: 1-7.
- Guo, J.H., X.J. Liu, Y. Zhang, J.L. Shen, W.X. Han, W.F. Zhang, P. Christie, K.W.T. Goulding, P.M. Vitousek y F.S. Zhang. 2010.** Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327: 1008-1010.
- Gupta, M.P. 1995.** 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. CYTED. SECAB. *Ciencia y Tecnología* 55-617. Bogotá. Colombia.
- Gutiérrez-Zamora, E. y M.L. Martínez-Romero. 2001.** Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) *Journal of Biotechnology* 91: 117-126.
- Haas, D. y C. Keel. 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41: 117-153.
- Haas, D., C. Keel, y C.C. Reimann. 2002.** Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 385-395.
- Habib, H. y K.M. Fazili. 2007.** Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 2: 68-85.
- Hadi, F. y A. Bano. 2010.** Effect of diazotrophs (*Rhizobium* and *Acetobacter*) on growth of maize (*Zea mays* L.) and accumulation of lead (Pb) in different plant parts. *Pakistan Journal of Botany* 42, 6: 4363-4370.
- Hammerschmidt, R. 1993.** The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores, and wounds. *Advances in Plant Pathology* 10: 307-337.
- Hammond-Kosack, K.E. y J.D.G. Jones. 2000.** Response to plant pathogens. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 1102-1156. ASPP Press, Rockville. Maryland. Estados Unidos.
- Han, H.S. y K.D. Lee. 2005.** Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability, and growth of egg plant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1: 176-180.
- Hardik, A.P., R.K. Patel, S.M. Khristi, K. Parikh y G. Rajendran. 2012.** Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes From *Lycopersicon esculentum* Plant and Their Plant Growth Promoting Characteristics. *Nepal Journal of Biotechnology* 2, 1: 37-52.
- Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid y I. Ahmed. 2010.** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60, 4: 579-598.
- Herrmann, L. y D. Lesueur. 2013.** Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 8859-8873.

## Bibliografía

- Higa, T. y J.F. Parr. 2010.** Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. Ed. P.A. Rueda Peña. Centro internacional de Agricultura Natural. Beltsville Maryland. Estados Unidos.
- Hill, P.W., K.A. Marsden y D.L. Jones. 2013.** How significant to plant N nutrition is the direct consumption of soil microbes by roots? *New Phytologist* 199: 948-955.
- Hillier, J., C. Hawes, G. Squire, A. Hilton, S. Wale y P. Smith. 2009.** The carbon footprints of food crop production. *International Journal of agricultural sustainability*. 7. 2: 107-118.
- Hiltner, L. 1904.** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*. 98: 59-78.
- Hinsinger, P. 2009.** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321: 1-2.
- Hirsch, P.R. 1996.** Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytologist* 133: 159-171.
- Höflich, G., W. Wiehe y G. Kühn. 1994.** Plant growth stimulation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50: 897-905.
- Hofman, G. y O. Van Cleemput. 2004.** Nitrogen in Soil and Plant 48. IFA, Paris, Francia.
- Honma, M. y T. Shimomura. 1978.** Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 42: 1825-1831.
- Horta, M.C., y J. Torrent. 2007.** The Olsen P method as an agronomic and environmental test for predicting phosphate release from acid soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 77: 283-292.
- Huang, L.F., L.X. Song, X.J. Xia, W.H. Mao, K. Shi, Y.H. Zhou y J.Q. Yu. 2013.** Plant-Soil Feedbacks and Soil Sickness: From Mechanisms to Application in Agriculture. *Journal of Chemical Ecology* 39: 232-242.
- Humbert, R.P. 2013.** The Growing of Sugar Cane. The nutrition of Sugar Cane. Elsevier 4: 114-301.
- Humphry, D.R., M. Andrews, S.R. Santos, E.K. James, L.V. Vinogradova, L. Perin, V.M. Reis, y S.P. Cummings. 2007.** Phylogenetic assignment and mechanism of action of a crop growth promoting *Rhizobium radiobacter* strain used as a biofertilizer on *graminaceous* crops in Russia. *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 105-113.
- Hussain, M.B., Z.A. Zahir, H.N. Asghar y M. Asghar. 2014.** Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat? *International Journal of Agriculture and Biology* 16: 3-13.
- INIA. 2009.** Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Conservación y manejo de suelos, producción vegetal, desarrollo rural y economía agraria. 27. Madrid. España
- INPOFOS Instituto de la Potasa y el Fosforo. 1993.** Diagnóstico del estado nutricional de los cultivos. INPOFOS 55. Quito, Ecuador.
- International Fertilizer Industry Association (IFA), 2010.** Energy Efficiency and CO2 Emissions in Ammonia Production: 2008–2009 Summary Report. IFA, Paris.



- Isobe, K. y N. Ohte. 2014.** Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments* 29, 1: 4-16.
- Jackson, L.E., M. Burger y T.R. Cavagnaro. 2008.** Roots, Nitrogen Transformations, and Ecosystem Services. *Annual Review of Plant Biology* 59: 341-363.
- James, E.K. 2000.** Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65, 2-3: 197-209.
- James, E.K., P. Gyaneshwar, N. Mathan, W.L. Barraquio, P.M. Reddy, P.P.M. Iannetta, F.L. Olivares y J.K. Ladha. 2002.** Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 9: 894-906.
- Jan, A., C. Vriezen, F.J. Bruijn y K. Nüsslein. 2007.** Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 3451-3459.
- Jejcic, V. y F. Al Mansour. 2014.** Carbon footprint of conventional and organic crop production. *Actual Tasks on Agricultural Engineering-Zagreb*, 42: 447-457.
- Jetten, M.S.M. 2008.** The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* 10: 2903-2909.
- Jones J.D. y J.L. Dangl. 2006.** The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jordan, D.C. 1984.** *Rhizobiaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1: 234-242. N.R. Krieg y J.G. Holt (Eds). Williams and Wilkins. Baltimore. Maryland. Estados Unidos.
- Jordan-Meille, L., G.H. Rubaek, P.A.I. Ehlert, V. Genot, G. Hofman, K. Goulding, J. Recknagel, G. Provolo y P. Barraclough. 2012.** An overview of fertilizer-P recommendations in Europe: soil testing, calibration and fertilizer recommendations. *Soil Use and Management* 28: 419-435.
- Kalaiselvi, P. y S. Anthonira. 2009.** In vitro solubilization of silica and potassium from silicate minerals by silicate solubilizing bacteria. *Journal of Ecobiology* 24, 2: 159-68.
- Kallenbach, C. y A.S. Grandy. 2011.** Controls over soil microbial biomass responses to carbon amendments in agricultural systems: a meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 144: 241-252.
- Kalra, A.M. A. Chandra, A.K. Awasthi, S. Singh y S. Khanuja. 2010.** Natural compounds enhancing growth and survival of rhizobial inoculants in vermicompost-based formulations. *Biology and Fertility of Soils* 46: 521-524.
- Kang, G., B. Taek, W. Kimm, H.S. Yun y S.C. Chang. 2010.** Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports* 4: 179-183.
- Kang, S.G., M. Joo, C. Hamayun, D. H. Na, Y. Shin, J. Kim, y I. Lee. 2009.** Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*. 31: 277-291.
- Kaymak, H.C., I. Guvenc, F. Yarali y M.F. Donmez. 2009.** The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33, 2: 173-179.
- Keller, C. y M. Baggiolini. 1954.** Les stades repérés dans la vegetation du blé. *Revue Romande d'Agriculture* 10, 3: 17-30.

## Bibliografía

- Khalid, A., M. Arshad y Z.A. Zahir. 2004.** Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96: 473-480.
- Khan, M.S., A. Zaidi y P.A. Wani. 2007.** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agronomy for Sustainable Development* 27: 29-43.
- Khavazi, K., F. Rejali, P. Seguin y M. Miransari. 2007.** Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 780-784.
- Kirkby E.A. y D. J. Pilbeam. 2006.** Calcium as a plant nutrient. *Plant, Cell and Environment* 7, 6: 397-405.
- Kloek, A.P., M.L. Verbsky, S.B. Sharma, J.E. Schoelz, J. Vogel, D.F. Klessig y B.N. Kunkel. 2001.** Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal* 26: 509-522.
- Klopper, J.W. 2007.** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal Microbiology* 53: 159-167.
- Klopper, J.W. y M.N. Schroth, 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. of the 4<sup>th</sup> Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter. Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie* 2: 879-882. INRA. Angers. Francia.
- Klopper, J.W., C.M. Ryu y S. Zhang. 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology Journal* 94: 1259-1266.
- Körschens, M., E. Albert, M. Armbruster, D. Barkusky, M. Baumecker, L. Behle-Schalk, R. Bischoff, Z. Cergan, F. Ellmer, F. Herbst, S. Hoffmann, B. Hofmann, T. Kismanyoky, J. Kubat, E. Kunzova, C. Lopez-Fando, I. Merbach, W. Merbach, , M.T. Pardor, J.Rogasik, J. Rühlmann, H. Spiegel, E. Schulz, A. Tajnsek, Z. Toth, H. Wegener y W. Zorn. 2013.** Effect of mineral and organic fertilization on crop yield, nitrogen uptake, carbon and nitrogen balances, as well as soil organic carbon content and dynamics: results from 20 European long-term field experiments of the twenty-first century. *Archives of Agronomy & Soil Science* 59: 1017-1040.
- Kroeze, C. 1994.** Nitrous Oxide, Emission inventory and options for control in the Netherlands. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven. Holanda.
- Kumar, K.V., S. Srivastava, N. Singh y H.M. Behl. 2009.** Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials* 170, 1: 51-57.
- Kumar, S., P. Pandey y D.K. Maheshwari. 2009.** Reduction in dose of chemical fertilizers and growth enhancement of sesame (*Sesamum indicum* L.) with application of rhizospheric competent *Pseudomonas aeruginosa* LES4. *European Journal of Soil Biology* 45: 334-340.
- Kuykendall, L.D. 2005.** Family I. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321AL. *In: Brenner D.J., Krieg N.R., Stanley, J.T. (Eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2: 324-361. Springer. Nueva York. Estados Unidos.
- Labrador, J. 2001.** La materia orgánica en los agrosistemas. (Ed.) MAPA/Mundi-Prensa. Madrid. España.

- Labrador, J. y M.A. Altier. 2001.** Agroecología y Desarrollo. Aproximación a los fundamentos agroecológicos para la gestión sustentable de agrosistemas mediterráneos. UNEX/Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Lavakush, J., J.P. Yadav, D.K. Verma, A. Jaiswal. 2014.** Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecological Engineering 62: 123-128.
- Lee S. y B. Hwang. 2006.** Exhibits an Antifungal Activity and its Overexpression Enhances Disease Resistance and Stress Tolerance. Plant Molecular Biology 61, 1-2: 95-109.
- León, L., M.C. Vega y R. Pérez. 2006.** El ácido indol-3-acético, una hormona vegetal sintetizada por los rizobios. 7: 77. In: Fijación de nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones. Eds: E.J. Bedman, J. González, C. Llunc y B. Rodelas. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- Lluch, J.M.O. 2007.** Cultivos herbáceos extensivos: cereales. 88. (Ed) Universidad Politécnica de Valencia.
- Long, S. R. 2001.** Genes and signals in rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiology 125: 69-72.
- Lorda, G., J.D. Breccia, V. Barbeito, F. Pagliero, S. Boeris, C. Castano, A. Pordomingo, F. Altolaguirre y M.D. Pastor. 2007.** Peat-based inoculum of *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii* supplemented with xanthan gum. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 1-5.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.
- Lu, M., Y. Yang, Y. Luo, C. Fang, X. Zhou, J. Chen, X. Yang y B. Li. 2011.** Responses of ecosystem nitrogen cycle to nitrogen addition: a meta-analysis. New Phytologist 189: 1040-1050.
- Lucas, J.A., B. Ramos Solano F. Montes. M. Megias y F.J. Gutierrez Mañero. 2009.** Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. Field Crops Research 114: 404-410.
- Lugtenberg, B. y F. Kamilova. 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology 63: 541-56.
- Lupwayi N. Z., G.W. Clayton, K. G. Hanson, W. A. Rice y V. O. Biederbeck. 2004.** Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. Canadian Journal of Plant Science 84, 1: 37-45.
- Lupwayi, N.Z., P.E. Olsen, E.S. Sande, H.H. Keyser, M.M. Collins, P.W. Singleton y W.A. Rice. 2000.** Inoculant quality and its evaluation. Field Crops Research 65, 259-270.
- Machado, R.G., E.L.S. Sá, M. Bruxel, A. Giongo, N.S. Santos y A.S. Nunes. 2013.** Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). International Journal of Agriculture and Biology 15: 827-834.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, alimentación y Medio Ambiente. 2011.** Seminario de Comercio Exterior Agrario y Pesquero. En: [www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/seminarios-de-analisis-y-prospectiva/cex](http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/seminarios-de-analisis-y-prospectiva/cex).

## Bibliografía

- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, alimentación y Medio Ambiente. 2012.** Material vegetal. El maíz dulce. En: [www.magrama.gob.es/app/materialvegetal/fichamaterialvegetal.aspx?idficha=2201](http://www.magrama.gob.es/app/materialvegetal/fichamaterialvegetal.aspx?idficha=2201).
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, alimentación y Medio Ambiente. 2014.** Anuario estadístico Madrid 2014. En: [www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE\\_2013\\_Completo.pdf](http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE_2013_Completo.pdf)
- Mahaffee, W.F. y J.W. Kloepper. 1994.** Applications of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In: Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V., Grace P.R. (eds) Soil biota: management in sustainable farming systems 23-31. CSIRO. Melbourne. Australia
- Maheshwari, D.K., R.C. Dubey, A. Aeron, B. Kumar, S. Kumar, S. Tewari y N.K. Arora. 2012.** Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicus* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 28: 3015-3024.
- Mallarino, A. 1993.** Acidez y encalado de los suelos; informaciones agronómicas N° 20 (Ed) J. Espinosa. Ecuador.
- Mallarino, A. 2001.** Manejo de la fertilidad con fósforo y potasio para maíz y soja en el centro-oeste de los Estados Unidos. Jornada de Actualización Profesionales "Fertilidad 2001". Instituto del Fósforo y la Potasa INPOFOS. Buenos Aires. Argentina.
- Malusá, E., L. Sas-Paszt, y J. Ciesielska. 2012.** Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal* v. 2012. Skierniewice. Polonia.
- Manikandan, R., D. Saravanakumar, L. Rajendran, T. Raguchander y R. Samiyappan. 2010.** Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control* 54: 83-89.
- Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. 2012.** J.M. Chaparro, A.M. Sheflin, D.K. Manter y J.M. Vivanco. *Biology and Fertility of Soils* 48: 489-499.
- Mantelin, S. y B. Touraine. 2004.** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* 55: 27-34.
- Mantelin, S., S. Fischer-Le, M., Zakhia, F. Béna, G. Bonneau, S. Jeder, H. Lajudie, P. y J.C. Cleyet-Marel. 2006.** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 827-839.
- Marks, B.B., M. Megías, M.A. Nogueira y M. Hungria. 2013.** Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*, 3: 21.
- Marschner, P., C.H. Yang, R. Lieberei, y D.E. Crowley. 2001.** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1437-1445.
- Matson, P.A., W.J. Parton, A.G. Power y M.J. Swift. 1997.** Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science* 25, 277: 504-509.
- Matsuoka, Y. 2011.** Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant and Cell Physiology* 52, 5: 750-764.

- Mayak, S., T. Tirosh y B.R. Glick. 2004.** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 6: 565-72.
- Mc. Faddin. 1985.** Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. Vol. 1. Williams y Wilkins. Maryland. Estados Unidos.
- Mc. Laughlin, M.J., T.M. McBeath, R. Smernik, S.P. Stacey, B. Ajiboye y C. Guppy. 2011.** The chemical nature of P accumulation in agricultural soils implications for fertiliser management and design: an Australian perspective. *Plant and Soil* 349: 69-87.
- Megías, M., R. Rivilla, M.J. Soto, M.J. Delgado, E. González, P. Mateos, M. León, B. Rodelas y E.J. Bedmar. 2011.** Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismo. 24: 361. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).
- Mehboob, I. M. Naveed, y Z.A. Zahir. 2009.** Rhizobial Association with non legumes: Mechanisms and Applications. *Critical Reviews in Plant Science* 28: 432-456.
- Mehboob, I., Z.A. Zahir, M. Archad A. Tanveer y F. Azam. 2011.** Growth Promoting Activities of Different *Rhizobioum* spp., in wheat. *Pakistan Journal of Botany* 43, 3: 1643-1650.
- Mendes, F. y I. Videira. 2005.** Residues of the cork Industry as carriers for the production of Legume Inoculants. *Silva Lusitana* 13, 2: 159-167.
- Mendes-Ferreira, E. y I. Videira-Castro. 2013.** Residues of the Cork Industry as Carriers for the Production of Legume Inoculants. *Silva Lusitana* 2: 159-167.
- Mengel, K. y E.A. Kirkby. 1987.** Principles of plant nutrition. International Potash Institute. Bern. Switzerland.
- Miransari, M. 2011.** Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 917-930.
- Mirshekari, B., S. Hokmalipour, R.S. Sharifi, F. Farahvash y A. Ebadi. 2012.** Effect of seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and dry matter accumulation of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) at various levels of nitrogen and phosphorus fertilizers. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10, 3 y 4: 314-320.
- Mirza, M.S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand y K.A. Malik. 2001.** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil* 237: 47-54.
- Misaghi, I.J. y C.R. Donndelinger. 1990.** Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80, 808-811.
- Mishra, R.P.N., R.K. Singh, H.K. Jaiswal, M.K. Singh, Y.G. Yanni y F.B. Dazzo. 2008.** Rice–Rhizobia Association: Evolution of an Alternate Niche of Beneficial Plant–Bacteria Association. *In*: I. Ahmad, J. Pichtel y S. Hayat (eds). *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Molina-Cano, J.L. 1989.** En: La cebada. Morfología, genética, agronomía y usos industriales. Ed. J. L. Molina-Cano. Mundi-Prensa 199-216. Madrid. España.

## Bibliografía

- Molina-Cano, J.L. P. Framon, G. Salcedo, C. Aragoncillo, F.R. Togores, y F. García-Olmedo. 1987.** Morocco as a possible domestication center for barley: Biochemical and Agromorphological Evidence. *Theoretical and Applied Genetics* 73: 531-536.
- Montesinos, E., A. Bonaterra, E. Badosa, J. Francés, J. Alemany, I. Llorente, y C. Moragrega. 2002.** Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology* 5: 169-175.
- Moschetti, G., A. Peluso, A. Protopapa, M. Anastasio, O. Pepe y R. Defez. 2005.** Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 619-631.
- Mueller, N.D., J.S. Gerber, M. Johnston, K. R. Deepak, N. Ramankutty y J.A. Foley. 2012.** Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature* 490: 254-257.
- Muhammad, S., M. Saleem, M. Riaz, Z. Iqbal y M. Ashraf. 2013.** PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology* 57: 27-34.
- Mulas, D. 2010.** Caracterización y selección de rizobios de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en I.G.P. "Alubia de La Bañeza-León". (Tesis Doctoral). Directores: González, F., Casquero, P.A. y Velázquez E. Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad de León. León. España.
- Mulas, D., C.A. Díaz, R. Mulas, I. Marcano, M. Barquero, P. Serrano, F. González-Andrés. 2012.** Inoculants based in autochthonous microorganisms, a strategy to optimize agronomic performance of biofertilizers. Beneficial plant-microbial interaction: Ecology and application. Rodelas B, González J. CRC3 (Eds). Taylor and Francis. Portland. Oregon. Estados Unidos.
- Mulas, D., P. García-Fraile, L. Carro, M.H. Ramírez-Bahena, P. Casquero, E. Velázquez, F. González-Andrés. 2011.** Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 2283-2293.
- Muñoz-Rojas, J. y J. Caballero-Mellado. 2003.** Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology* 46: 454-464.
- Murset, V., H. Hennecke y G. Pessi. 2012.** Disparate role of rhizobial ACC deaminase in root-nodule symbioses. *Symbiosis* 57: 43-50.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi y C. Lakshminarasimhan. 1999.** Influence of N-fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biology and Fertility of Soils* 29: 157-164.
- Muthukumarasamy, R., G. Revathi, y P. Loganathan. 2002.** Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant and Soil* 243: 91-102.
- Nadeem, S.M., Z.A. Zahir, M. Naveed y M. Arshad. 2007.** Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Canadian Journal Microbiology* 53: 1141-1149.

- Nannipieri, P., L. Giagnoni, G. Renella, E. Puglisi, B. Ceccanti, G. Masciandaro, F. Fornasier, M. C. Moscatelli y S. Marinari. 2012.** Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and Fertility of Soils* 48: 743-762.
- Naveed, M. Z.A. Zahir, M. Khalid, H.N. Asghar, M.J. Akhtar y M. Arshad. 2008.** Rhizobacteria containing ACC-Deaminase for improving growth and yield of wheat under fertilized conditions. *Pakistan Journal of Botany* 40, 3: 1231-1241.
- Nevo, E. 1992.** Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum* in the Fertile Crescent. In P.R. Shewry, ed. *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. 19-43. C.A.B. International, The Alden Press, Oxford. Reino Unido.
- Nezarat, S. y A. Gholami. 2009.** Screening Plant Growth Promoting Rhizobacteria for improving seed Germination, Seedling growth and yield of maize. *Pakistan Journal of Biological Science* 12, 1: 26-32.
- Noel, K.D. 2009.** Rhizobia. 261-277. 3<sup>th</sup> Edition. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford. Reino Unido.
- Noel, T.C., C. Sheng, C.K. Yost, R.P. Pharis y M.F. Hynes. 1996.** *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 279-283.
- O'Hara, F. y K.T. Shanmugam. 1976.** Regulation of nitrogen fixation by rhizobia export of fixed N<sub>2</sub>. *Biochimica et Biophysica Acta* 437: 213-325 Amsterdam, Holanda.
- O'Hara, G.W., T.J. Goss, M.J. Dilworth y A.R. Glenn. 1989.** Maintenance of intracellular pH and acid-tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1870-1876.
- Ogunseitan, O. 2005.** Microbial diversity: form and function in prokaryotes. Blackwell Science p 142. Massachusetts. Estados Unidos.
- Okunishi, S., K. Sako, H. Mano, A. Imamura y H. Morisaki. 2005.** Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes and Environment* 20: 168-177.
- Oliveira, L.P., M.J. Rossi, A. Furigo, G.N. Silva y V.L. Oliveira. 2006.** Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 3: 251-255.
- Olsen, S.R., C.V. Cole, F.S. Watanabe y L.A. Dean. 1954.** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circ. 939. USDA, Washington, D.C. Estados Unidos.
- Omar, S.A. y M. Ismael. 1999.** Microbial populations, ammonification and nitrification in soil treated with urea and inorganic salts. *Folia Microbiologica* 44: 205-212.
- Ormeño, E., R. Torres, J. Mayo, R. Rivas, A. Peix, E. Velázquez y D. Zúñiga. 2007.** *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. *Developments in Plant and Soil Sciences* 102: 143-147.
- Pandey, P., S. Arora, A. Sood, S. Bisht y D.K. Maheshwar. 2010.** Formulation of an effective *Rhizobium* bioinoculant using green fluorescent protein reporter system. Kai, L. (ed). *In: International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering*; 462-466 World Scientific, Singapore. Malasia.
- Park, K.H., C.Y. Lee, y H.J. Son. 2009.** Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth promoting activities. *Letters in Applied Microbiology* 49: 222-228.

## Bibliografía

- Parmar, P. y S.S. Sindhu. 2013.** Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of microbiology research* 3, 1: 25-31.
- Patel, D., C.K. Jha, N. Tank y M. Saraf. 2012.** Growth Enhancement of Chickpea in Saline Soils Using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 31, 1: 53-62
- Paungfoo-Lonhienn, C., T.G.A. Lonhienne, D. Rentsch, N. Robinson, M. Christie, R.I. Webb, H.K. Gamage, B.J. Carroll, P.M. Schenk y S. Schmidt. 2008.** Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *PNAS* 105: 11 4524-4529.
- Paungfoo-Lonhienne C., D. Rentsch, S. Robatzek, R.I. Webb y E. Sagulenko. 2010.** Turning the Table: Plants Consume Microbes as a Source of Nutrients. *PLoS One* 5, 7: 11915.
- Peix A., A.A. Rivas-Boyer, P.F. Mateos, C. Rodríguez-Barrueco, E. Martínez-Molina y E. Velázquez. 2001.** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 103-110.
- Peix, A., R. Rivas, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, C. Rodríguez Barrueco y E. Velázquez. 2003.** *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 2067-2072.
- Peña, H. y I. Reyes. 2007.** Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfato en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* 32: 560-565.
- Penna, C., R. Massa, F. Olivieri, G. Gutkind y F. Cassán. 2011.** A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express* 1:21.
- Penrose, D.M. y B.R. Glick. 2001.** Levels of ACC and related compounds in exudates and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase containing plant growth-promoting bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 368-372.
- Penrose, D.M. y B.R. Glick. 2003.** Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118: 10-15.
- Pérez-Montaño, F., I. Jiménez-Guerrero, I. Baena-Ropero y F.J. López-Baena. 2014.** The Symbiotic Biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12 Necessary for Successful Colonization and Symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, s Regulated by Quorum Sensing Systems and Inducing Flavonoids via NodD1. *PLoS ONE* 9, 8: 105901.
- Perrine-Walker, F.M., J. Prayitno, B.G. Rolfe, J.J. Weinman y C.H. Hocart. 2007.** Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *Journal of Experimental Botany* 58, 12: 3343-3350.
- Persello-Cartieaux, F., L. Nussaume y C. Robaglia. 2003.** Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* 26: 189-199.
- Ping, L. y W. Boland. 2004.** Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 9: 263-276.
- Pollmann, S., P. Dücking y E.W. Weiler. 2009.** Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70, 523-531.
- Poonam, J. y S. Veena. Indian Journal of Microbiology. 2011.** In vitro sensitivity of *Rhizobium* and Phosphate Solubilising bacteria to herbicides 51, 2: 230-233.



- Poonguzhali, S., M. Madhaiyan y T.M. Sa. 2008.** Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 773-777.
- Prajapati, K., M.C. Sharma y H.A. Modi. 2013.** Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on *Abelmoscus esculantus*. *International Journal of Agricultural Sciences* 3, 1: 181-8.
- Puente-Redondo, V.A., N.G. Blanco, C.B. Gutiérrez-Martín, F.J. García –Peña y E.F. Rodríguez Ferri. 2000.** Comparison of different PCR Approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1016-1022.
- Quecine, C. 2008.** Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* 47: 486-491.
- Quiñones, B., G. Dulla y S.E. Lindow. 2005.** Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 18: 682-93.
- Raaijmakers, J.M., D.M. Weller y L.S. Thomashow. 1997.** Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 881-887.
- Raaijmakers, J.M., T.C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette e Y. Moëgne-Loccoz. 2009.** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341-361.
- Rajkumar, M., K.J. Lee, W.H. Lee y J.R. Banu. 2005.** Growth of *Brassica juncea* under chromium stress: influence of siderophores and indole-3-acetic acid producing rhizosphere bacteria. *Journal of Environmental Biology* 26: 693-699.
- Ramirez, K.S., C.L. Lauber, R. Knight, M.A. Bradford y N. Fierer. 2010.** Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology* 91: 3463-3470.
- Ramirez-Bahena, M.H., A. Peix, R. Rivas, M. Camacho, D. Rodriguez-Navarro, N., P.F. Mateos, E. Martinez-Molina, A. Willems y E. Velazquez, 2008.** *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1929-1934.
- Ramos-Solano, B., J. Barriuso-Maicas, M.T. Pereyra, J. Domenech y F.J. Gutiérrez-Mañero. 2008.** Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology* 98: 451-457.
- Rana, A., B. Saharan, L. Nain, R. Prasanna y Y.S. Shivay. 2012.** Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil Science and Plant Nutrition* 58: 573-582.
- Rana, A., M. Joshi, R. Prasanna, Y. Singh y L. Nain. 2012.** Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology* 50: 118-126.
- Raza, S., B. Jurnsgerd, H. Abou-Taleb y J.L. Christiansen. 2001.** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 32: 379-383.
- Rebah, B.F., D. Prévost, A. Yezza y R.D. Tyagi. 2007.** Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology* 98: 3535-3546.

## Bibliografía

- Reed, M.L.E., B.G. Warner y B.R. Glick. 2005.** Plant Growth-Promoting Bacteria Facilitate the Growth of the Common Reed *Phragmites australis* in the Presence of Copper or Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Current Microbiology* 51: 425-429.
- Rees, W.E. 1992.** Ecological footprints and appropriated carrying capacity: what urban economics leaves out. *Environment and Urbanization* 4, 2: 121-130.
- Rehm, G.W. 1986.** Effect of phosphorous placement on early growth, yield and phosphorous absorption by irrigated corn. *Journal of fertilizer issues* 3: 12-17.
- Reina-Bueno, M., M. Argandoña, J.J. Nieto, A. Hidalgo-García, F. Iglesias-Guerra, M.J. Delgado y C. Vargas. 2012.** Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiology* 12:207.
- Reina-Pinto, J.J. y A. Yephremov. 2009.** Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 540-549.
- Reitz, M., K. Rudolph, I. Schröder, S. Hoffmann-Hergarten, J. Hallmann y R.A. Sikora. 2000.** Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3515-3518.
- Remigereau, M.S., G. Lakis, S. Rekima, M. Leveugle y M.C. Fontaine. 2011.** Cereal Domestication and Evolution of Branching: Evidence for Soft Selection in the Tbl Orthologue of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*). *PLoS One* 6, 7: 22404.
- Ribaudó, C.M., E.M. Krumpholz, F.D. Cassan, R. Bottini, M.L. Cantore y J.A. Cura. 2006.** *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 175-185.
- Rigaud, J. y A. Puppo, 1975.** Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *Journal of general microbiology* 88: 223-228.
- Rivas, R., N. Vizcaíno, R. M. Buey, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina y E. Velázquez. 2001.** An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. *Journal of Microbiological Methods* 47: 59-63.
- Robledo, M., E. Velázquez, M.H. Ramírez-Bahena, P. García-Fraile, A. Pérez-Alonso, R. Rivas, E. Martínez-Molina y P.F. Mateos. 2011.** The celC gene, a new phylogenetic marker useful for taxonomic studies in *Rhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 393-399.
- Roncato-Maccari L.D.B., H.J.O. Ramos, F.O. Pedrosa, Y. Alquini, L.S. Chubatsu, M.G. Yates, L.U. Rigo, M.B.R. Steffens y E.M. Souza. 2003.** Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* 936. Maize colonization by *H. seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 39-47.
- Rose, M.T., R. Deaker, S. Potard C.K. Thi Tran, N. Thuy Vu y I.R. Kennedy. 2011.** The survival of plant growth promoting microorganisms in peat inoculant as measured by selective plate counting and enzyme-linked immunoassay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1649-1659.
- Rousk, J. 2010.** Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4: 1340-1351.

- Saharan, B.S. y V. Nehra. 2011.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Department of Microbiology, Kurukshetra University, Kurukshetra, Haryana 119-136, Life Sciences and Medicine Research. India.
- Salamone, I.E.G., R.K. Hynes y L.M. Nelson. 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 404-11.
- Sánchez-Contreras M., J. Imperial y E.J. Bedmar. 2011.** Percepción de Quórum en rizobios. 15: 240. In: *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismo.* (Eds): M. Megías, R. Rivilla, M.J. Soto, M.J. Delgado, E. González, P. Mateos, M. León, B. Rodelas y E.J. Bedmar. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- Schachtman, D.P. Reid, R.J. y S.M. Ayling. 1998.** Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology* 116: 447-453.
- Schalk, I.J., M. Hannauer y A. Braud. 2011.** New roles for bacterial siderophores in metal trans- port and tolerance. *Environmental Microbiology* 13: 2844-54.
- Schmidt, S., T. Nasholm y D. Rentsch. 2014.** Organic nitrogen OrgN. International workshop on organic nitrogen and plant nutrition – from molecular mechanisms to ecosystems. Monte Verita, Ascona, Switzerland. *New Phytologist* 203: 29-31.
- Scholz, R.W., A.E. Ulrich, M. Eilittä y A. Roy. 2013.** Sustainable use of phosphorus: A finite resource. *Science of the Total Environment* 461-462, 799-803.
- Schonian, G., O. Meusel, H.J. Tietz, W. Meyer, Y. Graser, I. Tausch, W. Presber y T.G. Mitchell. 1993.** Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses* 36: 171-179.
- Schulze-Lefert, P. y S. Robatzek. 2006.** Plant pathogens trick guard cells into opening the gates. *Cell* 8: 126, 5: 831-844.
- Schwyn, B. y J.B. Neilands. 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Serna, O.S. 1996.** Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. 30-85. (Ed.) Editar. México D. F. Méjico.
- Shaharoon, B., M. Arshad, Z.A. Zahir y A. Khalid. 2006.** Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2971-2975.
- Shaharoon, B., M. Naveed, M.Arshad y Z.A. Zahir. 2010.** 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.
- Shahzad, S.M., M.S. Arif, M. Riaz, Z. Iqbal y M.Ashraf. 2013.** PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology* 57: 27-34.
- Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi y T.A. Gobi. 2013.** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2: 587.

## Bibliografía

- Shen, J.C., Li, G. Mi, L. Li, L. Yuan, R. Jiang y F. Zhang. 2013.** Maximizing root/rhizosphere efficiency to improve crop productivity and nutrient use efficiency in intensive agriculture of China. *Journal of Experimental Botany* 64, 5: 1181-1192.
- Shenoy, V.V. y G.M. Kalagudi, 2005.** Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology Advances* 23: 501-5013.
- Siddikee, M.A., P.S. Chauhan, R. Anandham, G.H. Han y S.J. Tongmin. 2010.** Isolation, Characterization, and Use for Plant Growth Promotion Under Salt Stress, of ACC Deaminase-Producing Halotolerant Bacteria Derived from Coastal Soil. *Microbiological Biotechnology* 20, 11: 1577-1584.
- Simon, R., U. Priefer y A. Puhler. 1983.** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.
- Sindhu, S.S., P. Parmar y M. Phour. 2012.** Nutrient cycling: potassium solubilization by microorganisms and improvement of crop growth. In: Parmar, N. y A. Singh (Eds). *Geomicrobiology and biogeochemistry: soil biology*. New York. EEUU.
- Singh, J.S., V.C. Pandey y D.P. Singh. 2011.** Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140, 339-353.
- Singh, M.K., C. Kushwaha y R.K. Singh. 2009.** Studies on Endophytic Colonization Ability of Two Upland Rice Endophytes, *Rhizobium* sp. and *Burkholderia* sp., Using Green Fluorescent Protein Reporter. *Current Microbiology* 59, 240-243.
- Singh, M.V., B.R. Maurya y J.P. Verma. 2014.** Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiological Research* 169, 5-6: 337-347.
- Somers, D.J. y P. I. Keith Edwards. 2004.** A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1105-1114.
- Somers, E., J. Vanderleyden, y M. Srinivisam. 2004.** Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 205-240.
- Spaepen, S., F. Das, E. Luyten, J. Michiels y J. Vanderleyden. 2009.** Indole-3-acetic acid regulated genes in *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiology Letters* 291: 195-200.
- Sprent, J. I. y R. Parsons. 2000.** Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research* 65: 183-196.
- Stefan M., N. Munteanu, V. Stoleru, M. Mihasan y L. Hritcu. 2013a.** Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae* 151: 22-29.
- Stefan, M., N. Munteanu, V. Storeru y M. Mihasan. 2013b.** Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. *Romanian Biotechnological Letters* 18: 2.
- Streeter, J.G. 2003.** Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology* 95: 484-491.
- Sugumaran, P. y B. Janarthanam. 2007.** Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World Journal of Agricultural Sciences* 3: 350-5.

- Suzuki, W., M. Sugawara, K. Miwa y M. Morikawa. 2014.** Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118, 1: 41-44.
- Syers, J.K., A.E. Johnston, y D. Curtin. 2008.** Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use. *Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* 18. FAO. Roma. Italia.
- Taiz L. y E. Zeiger 2006.** *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood City. Estados Unidos.
- Tajini, F., M. Trabelsi y J.J. Drevon. 2011.** Co-inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases P use efficiency for N<sub>2</sub> fixation in common bean under P deficiency in hydroaerobic culture. *Symbiosis* 53: 123-129.
- Tajini, F., M. Trabelsi y J.J. Drevon. 2012.** Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 157-63.
- Temprano, F.J., D.N. Rodríguez y M. Alvareda. 2006.** Inoculantes de Rhizobium: tipos, soportes sólidos e inoculación de semillas. 27: 306. *In: Fijación de nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones*. Eds: E.J. Bedman, J. González, C. Llunc y B. Rodelas. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- Thies, J.E., W.P. Singleton y B.B. Bohlool. 1991.** Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1: 19-28.
- Tilman, D., J. Fargione, B. Wolff, C. D'Antonio, A. Dobson, R. Howarth, D. Schindler, W.H. Schlesinger, D. Simberloff y D. Swackhamer. 2001.** Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science* 292, 5515: 281-284.
- Tittabutr, P., W. Payakapong, N. Teaumroong, P.W. Singleton y N. Boonkerd. 2007.** Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *Science Asia* 33: 69-77.
- Tótha, G., R.A. Guicharnauda, B. Tóthb y T. Hermann. 2014.** Phosphorus levels in croplands of the European Union with implications for P fertilizer use. *European Journal of Agronomy* 55: 42-52.
- Trabelsi, D. y R. Mhamdi. 2013.** *Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review*. Hindawi Publishing Corporation. (Ed.) A. Cherif. Bio Med Research International Hammam. Túnez.
- Trabelsi, D., H.B. Ammar, A. Mengoni y R. Mhamdi. 2012.** Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. *Soil Biology y Biochemistry* 54: 1-6.
- Trenkel, M.E. 2010.** Slow- and controlled-release and stabilized fertilizers. An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture. International fertilizer industry association. IFA, Paris, France.
- Trujillo, M.E., P.A. Vega, L. Carro, P. Martínez y E. Martínez. 2011.** Actinobacterias endófitas de raíces y nódulos fijadores de nitrógeno: Papel ecológico y potencial biotecnológico. 20: 305. *In: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismo*.

## Bibliografía

- (Eds): M. Megías, R. Rivilla, M.J. Soto, M.J. Delgado, E. González, P. Mateos, M. León, B. Rodelas y E.J. Bedmar. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- Turan, M., M. Gulluce, N. von Wirén y F. Sahin. 2012.** Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175: 818-826.
- Upadhyay, S. K., J. S. Singh y D. P. Singh. 2011.** Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Pedosphere* 21, 2: 214-222.
- Valverde, A., J.M. Igual, A. Peix, E. Cervantes y E. Velázquez. 2006.** *Rhizobium lusitanum* sp. nov. A bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2631-2637.
- Van der Laan, M., J.G. Annandalea, K.L. Bristowa,b, R.J. Stirzakera y C.C. Preezc. 2014.** Modelling nitrogen leaching: Are we getting the right answer for the right reason? *Agricultural Water Management* 133, 74-80.
- Veneklaas, E.J., H. Lambers, J. Bragg, P.M. Finnegan, C.E. Lovelock, W.C. Plaxton, C.A. Price, W.R. Scheible, , M.W. Shane, P.J. White y J.A. Raven. 2012.** Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist* 195: 306–320.
- Verma, S.C., A. Singh, S.P. Chowdhury y A.K. Tripathi. 2004.** Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters* 26, 5: 425-429.
- Verma, S.C., J.K. Ladha y A.K. Tripathi. 2001.** Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology* 91: 127-141.
- Veronese, P., H. Nakagami, B. Bluhm, S. Abuqamar, X. Chen, J. Salmeron, R.A. Dietrich, H. Hirt, y T. Mengiste. 2006.** The membrane anchored Botritis Induced Kinase plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* 18: 257-273.
- Vessey, J.K. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586.
- Vincent, J.M. 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme. Blackwell Scientific. Oxford. UK.
- Vriezen, J.A., F.J. Bruijn y K. Nusslein. 2007.** Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Letters in Applied Microbiology* 42: 17178.
- Wackernagel, M. 1994.** Ecological Footprint and Appropriated Carrying Capacity: a Tool for Planning Toward Sustainability (PhD thesis). The University of British Columbia, School of Community and Regional Planning, Vancouver, Canada.
- Wani, P.A., M.S. Khan y A. Zaidi. 2007a.** Co-inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agronomica Hungarica* 55: 315-323.
- Wani, P.A., M.S. Khan y A. Zaidi. 2007b.** Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (*vigna*) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by green gram plants. *Chemosphere* 70: 36-45.

- Wani, P.A., M.S. Khan y A. Zaidi. 2007c.** Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 283-287.
- Washington, J.A., E. Warren y A.G. Karlson. 1973.** Stability of barium sulfate turbidity standards. *Applied microbiology* 24, 6: 1013.
- Webster, G., C. Gough, J. Vasse, C.A. Batchelor, K J. O'Callaghan, S L. Kothari, M.R. Davey, J. Dénarié y E.C. Cocking. 1997.** Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Developments in Plant and Soil Sciences* 75: 115-122.
- Weller, D.M. 2007.** Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97: 250-256.
- Weyens, N., D. van der Lelie, S. Taghavi, L. Newman y J. Vangronsveld. 2009.** Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology* 27, 10: 591-598.
- Wiedmann, T. y J. Minx. 2008.** A definition of 'carbon footprint'. Ed: C.C. Pertsova, *Ecological Economics Research Trends*, 1: 1-11. Nueva York, EEUU.
- Winkel-Shirley, B. 2002.** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Plant Biology* 5, 3: 218-223.
- Wissuwa, M. 2003.** How Do Plants Achieve Tolerance to Phosphorus Deficiency? Small Causes with Big Effects. *Plant Physiology* 133: 4, 1947-1958.
- Withers, P.J., R. Sylvester-Bradley, D.L. Jones, J.R. Healey y P.J. Talboys. 2014.** Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environmental Science and Technology* 17, 48:12, 6523-30.
- Wu, G., J. Liu y Z. Ye. 2009.** Characterization of phosphobacteria isolated from eutrophic aquatic ecosystems. *Microbiology* 78: 769-775.
- Yadava, L.J., J.P. Verma, D.K. Jaiswal y A. Kumar. 2014.** Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering* 62 123-128
- Yang, J., J.W. Kloepper y C.M. Ryu. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 1-4.
- Yang, X., W. Gao, M. Zhang, Y. Chen y P. Sui. 2014.** Reducing agricultural carbon footprint through diversified crop rotation systems in the North China Plain. *Journal of Cleaner Production* 76: 131-139.
- Yanni, Y., R. Rizk, F. Abd-El Fattah, A. Squartini, V. Corich, F. de Bruijn, J. Rademaker, J. Maya-Flores, P. Ostrom, M. Vega-Hernández, R. Hollingsworth, E. Martínez-Molina, P. Mateos, E. Velázquez, J. Wopereis, E. Triplett, U. Umali-García, B. Rolfe, J.K. Ladha, J. Hilland y F.B. Dazzo. 2001.** The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 845-870.
- Yanni, Y.G. y F.B. Dazzo. 2010.** Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. *Plant and Soil* 336: 129-142.

## Bibliografía

- Yanni, Y.G., R.Y. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S.P. Hollingsworth, G. Orgambide, F. de Bruijn, J. Stoltzfus, D. Buckley, T.M. Schmidt, P.F. Mateos, J.K. Ladha y F.B. Dazzo. 1997.** Plant and Soil 194: 99-114.
- Zafar-ul-Hye, M., H. Muhammad, Z.A. Zahir, M. Hussain y A. Hussain. 2014.** Application of ACC-deaminase Containing Rhizobacteria with Fertilizer Improves Maize Production under Drought and Salinity Stress. International Journal of Agriculture and Biology 16: 3.
- Zahir, Z.A., A. Munir H.N. Asghar B. Shaharoon y M. Arshad. 2008.** Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. Journal of Microbiology and Biotechnology 18, 5: 958-963.
- Zahir, Z.A., M. Arshad y W.T.J. Frankenberger. 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy 81: 97-168.
- Zahir, Z.A., M.K. Shah, M. Naveed y M.J. Akhter. 2010.** Substrate dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 20: 1288-1294.
- Zaidi, A., M.S. Khan, M. Ahemad y M. Oves. 2009.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 56: 263-284
- Zamioudis, C. y C.M.J. Pieterse. 2012.** Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 25: 139-150.
- Zhang, A., G. Zhao, T. Gao, W. Wang, J. Li y S. Zhang. 2013.** Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: a soil microorganism with biological control potential. African Journal of Microbiology Research 7, 1: 41-7.