



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Universidad de Salamanca  
Departamento de Microbiología y Genética

**“Caracterización y selección de bacterias y hongos micorrícicos aislados en raíces de alubia y pimiento, en la provincia de León, para el desarrollo de biofertilizantes”**

**TESIS DOCTORAL**

Marcia Barquero Quirós

2014



**VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Fernando González Andrés**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad de León, **M<sup>a</sup> de la Encarnación Velázquez Pérez**, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y **Arsenio Terrón Alfonso**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental de la Universidad de León, autorizan la presentación de la Tesis Doctoral “**Caracterización y selección de bacterias y hongos micorrícicos aislados en raíces de alubia y pimiento, en la provincia de León, para el desarrollo de biofertilizantes**”, realizada bajo su dirección por la **MSc. Doña. Marcia Barquero Quirós**.

En Salamanca, a 28 de julio de 2014

LOS DIRECTORES

Fdo: Fernando González Andrés

Fdo: M<sup>a</sup> Encarnación Velázquez Pérez

Fdo.: Arsenio Terrón Alfonso

**Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí.**

*Confucio*



## Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID), organismo que financió la beca doctoral de Marcia Barquero Quirós, y a la Junta de Castilla y León que financió el proyecto LE029A10-2, que hizo posible el desarrollo de la presente investigación.

La autora agradece a los directores de Tesis: Dr. Fernando González, Dra. Encarnación Velázquez y Dr. Arsenio Terrón por el apoyo, dedicación y esfuerzo brindado a lo largo de la investigación.

La investigación fue realizada en el Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad de la Universidad de León (IMARENABIO) y en los campos experimentales de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria de la Universidad de León (ESTIA), por lo que se agradece al Director del Instituto Dr. Antonio Morán y al personal de campo del ESTIA por su apoyo. También se agradece a todos los productores que participaron en este proyecto, entre ellos a Pepe de Sueros de Cepeda y José Ramón Bodega de la Huerta de Fresno.

Asimismo se agradece al grupo de micorrizas del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña (IRTA) en especial a la Dra. Cinta Calvet y a Montserrat Prat y al grupo de micorrizas de la Estación Experimental de Zaidín de Granada (EEZ), en especial a Javier Palenzuela, gracias por su atención y por transmitir su conocimiento.

También se agradece a los becarios y amigos que aportaron algo de su tiempo y sabiduría: Leticia Aller, Roberto Álvarez, Paula Serrano, Susana Robles, Juan Araujo, Iris Marcano, Sara Mayo, Carla Escapa, Daniel Blanco, Álvaro Rodríguez y Oscar González.

Gracias inmensas a mi familia, gracias por su paciencia y ánimo: A Guille, Concha, Paco, Maricarmen, mamá y papá.



## RESUMEN

El pimiento (*Capsicum annuum*) y la alubia (*Phaseolus vulgaris*) son dos cultivos de importancia agronómica en la provincia de León. La alubia variedad Riñón menudo y el pimiento morrón ecotipo “de Fresno” pertenecientes a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Alubia de la Bañeza-León” y “Pimiento de Fresno-Benavente”, respectivamente, son productos que demandan un alto estándar de calidad y que requieren una alternativa al uso de agroquímicos. El uso en la agricultura de microorganismos rizosféricos beneficiosos como rizobios, hongos micorrícicos (hongos AM) y bacterias promotoras de crecimiento (PGPR), solos o coinoculados, ha demostrado tener efectos positivos en la nutrición de las plantas y en el biocontrol de diversas enfermedades.

Entre los mecanismos de acción utilizados por estos microorganismos se encuentran la facilitación de la adquisición de recursos, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de sideróforos, de ácido indolacético (IAA), la degradación del etileno mediante la acción de la enzima ACC desaminasa, la producción de antibióticos y de enzimas líticas, la competencia y la resistencia sistémica inducida.

El objetivo general de este trabajo fue el desarrollo de biofertilizantes y biocontroladores basados en rizobacterias PGPR, hongos AM y rizobios autóctonos. Para lograrlo se determinó la biodiversidad y capacidad PGPR de rizobacterias asociadas a alubia y pimiento mediante técnicas moleculares como análisis de perfiles TP-RAPDs y de perfiles de RFLP denominados ARDRA. Asimismo se aislaron e identificaron taxónomica y molecularmente hongos AM también provenientes de estos cultivos. Se realizaron pruebas *in vitro* para evaluar características PGP de las rizobacterias y se realizaron ensayos en invernadero y campo para evaluar combinaciones de rizobacterias, rizobios y hongos AM para ser utilizadas como biofertilizantes. Además se realizaron pruebas *in vitro*, gnotobióticas y en invernadero para evaluar su eficacia como biocontroladores de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* en alubia y *Phytophthora capsici* en pimiento.

Se aislaron en total 122 cepas de rizobacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* y *Phyllobacterium* y seis aislados de hongos AM identificados como *Glomus mosseae*. Los ensayos en microcosmos no arrojaron resultados concluyentes con respecto a la promoción de crecimiento. De acuerdo con los ensayos en campo se obtuvieron diferencias altamente significativas entre tratamientos, siendo la coinoculación en alubia de *G. mosseae* (F), *Rhizobium leguminosarum* (LCS0306) y *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* (RVPB 2-2) y en pimiento de *G. mosseae* (A), *R. leguminosarum* (LET1910) y *Bacillus siamensis* (SCFB 3-1), los tratamientos que produjeron los mejores rendimientos en ambos cultivos, por encima de los obtenidos cuando se realizaron inoculaciones binarias o en solitario.

Por otra parte los ensayos de biocontrol indicaron que la combinación *R. leguminosarum* (LET1910) y la bacteria endofítica *B. siamensis* (SCFA 1-2) en alubia y el hongo AM *G. mosseae* (A) y la bacteria endofítica *B. pumilus* (SCFC 1-2) en pimiento fueron los tratamientos que mejor controlaron a *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* en alubia y *P. capsici* en pimiento.

## ABSTRACT

The sweet pepper (*Capsicum annuum*) and the common bean (*Phaseolus vulgaris*) are two traditional crops in León province (Spain) of agronomic importance. The variety of common bean Riñón menudo and of sweet pepper morrón ecotipo “de Fresno”, which belong to the Geographical Protected Indication (GPI) “Alubia de la Bañeza-León” and “Pimiento de Fresno-Benavente”, are high-quality, demanding crops that require an alternative to the use of chemical fertilizers and pesticides. The agricultural use of beneficial rhizospheric microorganisms, such as rhizobia, AM fungi and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), alone or in co-inoculation, has shown positive effects on plant nutrition and disease control.

The effects produced by these microorganisms are due to different modes of action, including nutrients uptake, nitrogen fixation, phosphate solubilization, production of siderophores and indolacetic acid (IAA), ethylene degradation catalyzed by the ACC deaminase, production of antibiotic and lytic enzymes, competence and induced systemic resistance.

The principal aim of this study was to develop biofertilizers and biocontrollers based on native PGPR, AM fungi and rhizobia. In order to achieve this aim, the biodiversity and PGPR ability of rhizobacteria associated with common bean and sweet pepper were determined using molecular techniques including TP-RAPDs and RFLP (ARDRA) profile analyze. Also, AM fungi from these crops were isolated and identified both taxonomically and molecularly. *In vitro*, greenhouse and field assays were done to evaluate rhizobacteria PGP characteristics, alone and coinoculated with rhizobia and AM fungus to be used as biofertilizers. Moreover, *in vitro*, gnotobiotic, and in greenhouse assays were done to evaluate their use as biocontrol agents of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in common bean and *Phytophthora cacpsici* in sweet pepper.

In total, 122 rhizobacteria strains were isolated from the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* y *Phyllobacterium* and six AM fungi isolates identified as *Glomus mosseae*. The results obtained from greenhouse trials were not conclusive with respect to growth promotion. In contrast, growth promotion trials in the field demonstrated highly significant differences between treatments; co-inoculation with *G. mosseae* (F), *Rhizobium leguminosarum* (LCS0306) and *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* (RVPB 2-2) in common bean and *G. mosseae* (A), *R. leguminosarum* (LET1910) and *Bacillus siamensis* (SCFB 3-1) in sweet pepper, produced higher yields in both crops, greater even than the yield of treatments in which only one or two microorganisms were inoculated.

On the other hand, the results obtained in biocontrol assays indicated that the rhizobia *R. leguminosarum* (LET1910) and PGPR *B. siamensis* (SCFA 1-2) co-inoculation treatment in common bean plants and AM fungus *G. mosseae* (A) and PGPR *B. pumilus* (SCFC 1-2) in sweet pepper showed the best biocontrol of *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* in common bean and *P. cacpsici* in sweet pepper.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>1. La alubia (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>3</b>
1.1. Origen de la alubia.....	3
1.2. El cultivo de la alubia.....	5
1.3. Producción de alubia y su importancia.....	7
1.4. La alubia en León y la IGP.....	9
<b>2. El pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....</b>	<b>12</b>
2.1. Origen del pimiento.....	13
2.2. El cultivo del pimiento.....	14
2.3. Importancia y producción del pimiento.....	15
2.4. El pimiento en León y la IGP.....	18
<b>3. Uso de fertilizantes en la agricultura.....</b>	<b>21</b>
3.1. Escenario mundial.....	21
3.2. Los fertilizantes.....	22
3.2.1. El nitrógeno.....	22
3.2.2. El fósforo.....	23
3.3. Fitosanitarios.....	24
3.4. Uso de fertilizantes y plaguicidas en España.....	25
3.5. Regulación de fertilizantes y productos fitosanitarios.....	26
<b>4. Inoculantes microbianos.....</b>	<b>28</b>
4.1. Producción y comercialización de inoculantes.....	28

4.2. Utilización de los inoculantes en España y en el mundo.....	31
<b>5. Escenario actual.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>34</b>

## **CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>41</b>
1.1. Biodiversidad de bacterias rizosféricas.....	43
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>44</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>44</b>
3.1. Muestreo y aislamiento de bacterias endofíticas.....	44
3.2. Evaluación <i>in vitro</i> de propiedades promotoras del crecimiento vegetal de los aislamientos provenientes de raíces.....	46
3.2.1. Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico.....	47
3.2.2. Determinación de la capacidad de producir sideróforos.....	47
3.2.3. Determinación de la capacidad de síntesis de auxinas.....	48
3.2.4. Determinación de actividad ACC desaminasa.....	50
3.2.5. Determinación de la capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno.....	52
3.3. Extracción de ADN genómico bacteriano.....	54
3.4. Amplificación del ADN para la obtención de perfiles de TP-RAPD.....	54
3.5. Análisis de los perfiles de RFLP del gen 16S rRNA.....	55
3.6. Secuenciación del gen 16S rRNA.....	56
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>56</b>
4.1. Cepas aisladas.....	56
4.2. Análisis de los perfiles de ARDRA.....	57

4.3. Análisis de los perfiles de TP-RAPD.....	60
4.4. Análisis del gen ribosómico 16S.....	61
4.5. Análisis de las capacidades como PGPR de las cepas aisladas.....	69
<b>5. Referencias.....</b>	<b>75</b>

## **CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS EN PLANTA PARA DETERMINAR SU CAPACIDAD COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>89</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>91</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>91</b>
3.1. Muestreo y aislamiento de bacterias endofíticas y hongos formadores de micorrizas arbusculares (hongos AM).....	91
3.1.1. Aislamiento y producción de esporas de hongos AM.....	92
3.1.2. Identificación de hongos AM.....	92
3.1.3. Determinación del número más probable (NMP).....	94
3.1.4. Tinción de raíces.....	94
3.2. Inoculación de bacterias endofíticas promotoras de crecimiento (PGPR) en plantas de alubia y pimiento en condiciones gnotobióticas.....	95
3.2.1. Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de alubia.....	96
3.2.2. Coinoculación del rizobio <i>R. leguminosarum</i> PGPR en plantas de alubia.....	97
3.2.3. Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de pimiento.....	98
3.3. Inoculación de combinaciones binarias de microorganismos para detectar compatibilidad, con la finalidad de estimular el crecimiento vegetal en microcosmos.....	99
3.3.1. Inoculaciones en plantas de alubia.....	100
3.3.2. Inoculaciones en plantas de pimiento.....	101

3.4. Inoculación en campo de microorganismos promotores de crecimiento en plantas de alubia variedad Riñón y pimiento morrón ecotipo “de Fresno” .....	102
3.4.1. Tratamiento del suelo antes de la siembra.....	102
3.4.2. Ensayo en alubia.....	103
3.4.3. Ensayo en pimiento.....	105
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>107</b>
4.1. Aislamiento de esporas micorrícicas, agrupación de los aislados por criterios morfológicos, producción de los propágulos y selección.....	107
4.1.1. Identificación de aislados de esporas micorrícicas.....	108
4.2. Número más probable (NMP) de esporas de hongos micorrícicos en el suelo.....	110
4.3. Inoculación de bacterias endofíticas (PGPR) en plantas de alubia y pimiento en condiciones gnotobióticas.....	112
4.3.1. Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de alubia.....	112
4.3.2. Coinoculación de plantas de alubia con <i>R. leguminosarum</i> y bacterias endofíticas PGPR.....	114
4.3.3. Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de pimiento.....	117
4.4. Inoculación de combinaciones binarias de microorganismos para detectar compatibilidad, con la finalidad de estimular el crecimiento vegetal en microcosmos.....	119
4.4.1. Inoculación de plantas de alubia con combinaciones binarias de hongos AM, PGPR y rizobios.....	119
4.4.2. Inoculación de plantas de pimiento con combinaciones binarias de hongos AM, PGPR y rizobios.....	123
4.5. Inoculación en campo de microorganismos promotores de crecimiento en plantas de alubia variedad Riñón y pimiento morrón ecotipo “de Fresno” .....	125
4.5.1. Ensayo en alubia.....	125

4.5.2. Ensayo en pimiento.....	133
<b>5. Referencias.....</b>	<b>147</b>

### **CAPÍTULO 3: BIOCONTROL**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>157</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>159</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>159</b>
3.1. Bacterias, hongos y material vegetal utilizado.....	159
3.2. Pruebas <i>in vitro</i> : enfrentamientos duales.....	159
3.3. Pruebas <i>in vivo</i> .....	160
3.3.1. Inoculación en plantas de alubia.....	161
3.3.2. Inoculación en plantas de pimiento.....	162
3.4. Pruebas en Invernadero: microcosmos.....	163
3.4.1. Inoculación en plantas de alubia.....	164
3.4.2. Inoculación en plantas de pimiento.....	165
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>167</b>
4.1. Pruebas <i>in vitro</i> : enfrentamientos duales.....	167
4.2. Pruebas <i>in vivo</i> .....	169
4.2.1. Inoculación en plantas de alubia.....	169
4.2.2. Inoculación en plantas de pimiento.....	173
4.3. Pruebas en Invernadero: microcosmos.....	175
4.3.1. Inoculación de plantas de alubia.....	175
4.3.2. Inoculación de plantas de pimiento.....	178
<b>5. Referencias.....</b>	<b>180</b>

DISCUSIÓN GENERAL.....	191
CONCLUSIONES.....	199
ANEXOS.....	203

## ÍNDICE DE TABLAS

### ANTECEDENTES

Tabla 1.1. Superficie, rendimiento y producción de alubia seca total y por comunidades autónomas en España en el año 2011.....	9
Tabla 1.2. Superficie, rendimiento y producción de pimiento por comunidades autónomas en España en el año 2011.....	19
Tabla 1.3. Representantes de inoculantes microbianos.....	30

### CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA

Tabla 2.1. Localización y georreferenciación de los suelos muestreados en el cultivo de alubia ( <i>P. vulgaris</i> L.) en la demarcación de la IGP “Alubia de La Bañeza-León” .....	47
Tabla 2.2. Localización y georreferenciación de los suelos muestreados en el cultivo del pimiento ( <i>C. annuum</i> L.) en la demarcación de la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente” .....	48
Tabla 2.3. Composición de las soluciones para la preparación del medio CAS agar.....	50
Tabla 2.4. Composición y elaboración del medio JMM modificado.....	51
Tabla 2.5. Composición y elaboración del medio DF sales libre de nitrógeno.....	54
Tabla 2.6. Composición y elaboración del medio para determinar la capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno.....	55
Tabla 2.7. Identificación de cepas según ARDRA (Grupo RFLP) y TP-RAPDs.....	60
Tabla 2.8. Cepas de bacterias endofíticas aisladas según cultivo, sitio de muestreo y género.....	70
Tabla 2.9. Resultados de las mejores cepas de rizobacterias endofíticas productoras de sideróforos y solubilizadoras de P.....	72
Tabla 2.10. Resultados de las mejores cepas de rizobacterias endofíticas productoras de IAA, con actividad ACC desaminasa y con capacidad para crecer en medio libre de N.....	73

## CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS EN PLANTA PARA DETERMINAR SU CAPACIDAD COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Tabla 3.1. Solución nutritiva Rigaud y Puppo.....	96
Tabla 3.2. Bacterias endofíticas inoculadas en plantas de alubia, según características <i>in vitro</i> .....	97
Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo YMA.....	98
Tabla 3.4. Bacterias endofíticas inoculadas en plantas de pimiento, según características <i>in vitro</i> .....	98
Tabla 3.5. Tratamientos de los ensayos de microcosmos en alubia y pimiento en invernadero.....	102
Tabla 3.6. Morfotipos de esporas de hongos micorrícicos encontrados en los suelos muestreados con cultivos de alubia y pimiento.....	108
Tabla 3.7. Identificación de los morfotipos de micorrizas aislados en suelos de Castilla y León.....	109
Tabla 3.8. Resumen del número más probable (NMP) de propágulos de hongos micorrícicos en suelos muestreados de alubia y pimiento.....	111
Tabla 3.9. Biomasa producida por plantas de alubia inoculadas en condiciones gnotobióticas con diferentes bacterias endofíticas.....	113
Tabla 3.10. Biomasa producida tras por plantas de alubia co-inoculadas en condiciones gnotobióticas, con <i>R. leguminosarum</i> , y diferentes bacterias.....	114
Tabla 3.11. Biomasa producida por plantas de pimiento inoculadas en condiciones gnotobióticas con diferentes bacterias endofíticas.....	118
Tabla 3.12. Comparación de los valores medios de seis variables dependientes, obtenidos en el experimento en microcosmos con alubia, inoculada con dos combinaciones binarias micorrizas (A, F) + <i>R. leguminosarum</i> .....	120
Tabla 3.13. Comparación de los valores medios de seis variables dependientes, obtenidos en el experimento en microcosmos con alubia, inoculada con dos combinaciones binarias micorrizas (A, F) + PGPR.....	121
Tabla 3.14. Comparación de los valores medios de seis variables dependientes, obtenidos en el experimento en microcosmos con alubia, inoculada con dos combinaciones binarias PGPR + <i>R. leguminosarum</i> .....	122

Tabla 3.15. Comparación de los valores medios para la variable biomasa aérea seca, obtenidos en el experimento en microcosmos con pimiento inoculado con las combinaciones binarias: Micorrizas + <i>R. leguminosarum</i> , Micorrizas + PGPR, y PGPR + <i>R. leguminosarum</i> .....	124
Tabla 3.16. Valores de la media cuadrática en el ANOVA para tratamientos y contrastes ortogonales entre tratamientos, de 11 variables dependientes, correspondiente al experimento con alubia Riñón en campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes.....	129
Tabla 3.17. Comparación de los valores medios de 11 variables dependientes obtenidas en el experimento de campo con alubia Riñón, inoculada con tres biofertilizantes.....	130
Tabla 3.18. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para 11 variables dependientes, obtenidos en el experimento de campo con alubia Riñón, inoculada con tres biofertilizantes.....	131
Tabla 3.19. Contenido de N, P, K, Ca, Mg en el grano de alubia, en el experimento de campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes.....	133
Tabla 3.20. Valores de la media cuadrática en el ANOVA para tratamientos y contrastes ortogonales entre tratamientos, de 11 variables dependientes, correspondiente al experimento con pimiento Morrón ecotipo “de Fresno” en campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes.....	142
Tabla 3.21. Comparación de los valores medios de 11 variables dependientes obtenidas en el experimento de campo con pimiento Morrón ecotipo “de Fresno”, inoculada con tres biofertilizantes.....	144
Tabla 3.22. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para 11 variables dependientes, obtenidos en el experimento de campo con pimiento Morrón ecotipo “de Fresno” inoculada con tres biofertilizantes.....	145
Tabla 3.23. Valores relativos al pH, grados Brix, Grados Baumé y contenido de N, P, K, Ca y Mg en los pimientos, en el experimento de campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes.....	147

### **CAPÍTULO 3: BIOCONTROL**

Tabla 4.1. Cepas bacterianas endofíticas inoculadas <i>in vivo</i> en plantas de alubia variedad Riñón para determinar su efecto biocontrolador sobre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	162
---	-----

Tabla 4.2. Cepas bacterianas endofíticas inoculadas <i>in vivo</i> en plantas de pimiento morrón ecotipo “de Fresno” para determinar su efecto biocontrolador sobre <i>P. capsici</i> .....	163
Tabla 4.3. Tratamientos de los ensayos de biocontrol de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> en alubia y <i>P. capsici</i> en pimiento en invernadero. ....	167
Tabla 4.4. Cepas bacterianas que produjeron un halo de inhibición del crecimiento en <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> y <i>P. capsici</i> en cultivo <i>in vitro</i> .....	168
Tabla 4.5. Severidad del ataque fúngico y biomasa producida por plantas de alubia en condiciones gnotobióticas inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> y diferentes bacterias endofíticas.....	172
Tabla 4.6. Severidad del ataque fúngico y biomasa producida por plantas de pimiento en condiciones gnotobióticas inoculadas con <i>P. capsici</i> y diferentes bacterias endofíticas.....	174
Tabla 4.7. Comparación de los valores medios de tres variables dependientes, obtenidos en microcosmos para el experimento de biocontrol de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> en alubia.....	176
Tabla 4.8. Comparación de los valores medios de tres variables dependientes, obtenidos en microcosmos para el experimento de biocontrol de <i>P. capsici</i> en pimiento.....	178

## ANEXOS

Tabla A.1. Características físico-químicas de los suelos incluidos en la IGP “Alubia de La Bañeza – León” en los que se tomaron muestras de suelos y raíces para la obtención de microorganismos endófitos.....	205
Tabla A.2. Características físico-químicas de los suelos incluidos en la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente” en los que se tomaron muestras de suelos y raíces para la obtención de microorganismos endófitos.....	206
Tabla A.3. Características físico-químicas de los suelos utilizados en los ensayos de microcosmos y campo.....	207
Tabla A.4. Historial de cultivo de fincas de origen de raíces para la obtención de microorganismos endofíticos.....	207

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para las cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León.....209

## ÍNDICE DE FIGURAS

### ANTECEDENTES

Figura 1.1. Plantas de <i>P. vulgaris</i> L.....	4
Figura 1.2. Cultivo de alubia en Sueros de Cepeda. León. Castilla y León.....	7
Figura 1.3. Promedio de producción entre los años 2008 y 2012 de los cuatro países mayores productores de alubia para grano.....	8
Figura 1.4. Evolución de superficie, rendimiento y producción de alubia para grano en España 2001-2011. ....	10
Figura 1.5. Variedades de Alubia de la IGP "Alubia de La Bañeza-León".....	11
Figura 1.6. Plantas de pimiento.....	16
Figura 1.7. Promedio de producción entre los años 2008 y 2012 de los cuatro países mayores productores de pimiento.....	17
Figura 1.8. Evolución de superficie, rendimiento y producción de pimiento fresco en España 2001-2011.....	18
Figura 1.9. Producción de pimiento por provincias en España (toneladas) en el año 2008.....	20
Figura 1.10. Frutos de pimiento morrón ecotipo "de Fresno".....	21
Figura 1.11. Evolución del consumo agrícola de N, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> y K <sub>2</sub> O en fertilizantes (toneladas) entre los años 1998 y 2012.....	26
Figura 1.12. Distribución del consumo de fitosanitarios en España en base a su facturación en 2012.....	27

### CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA

Figura 2.1. Perfiles ARDRA obtenidos con las enzimas <i>BanI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>Hinfl</i> , <i>Sau3AI</i> y <i>StuI</i> , en las bacterias endofíticas aisladas de raíces de alubia y pimiento.....	59
--	----

Figura 2.2. Perfiles TP-RAPD (A-H) obtenidos dentro de cada grupo RFLP (I-XIX) en las bacterias endofíticas aisladas de raíces de alubia y pimiento.....	63
Figura 2.3. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo alfa Proteobacteria.....	65
Figura 2.4. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo beta Proteobacteria.....	65
Figura 2.5. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo gamma Proteobacteria.....	67
Figura 2.6. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo <i>Bacilli</i> .....	69
Figura 2.7. Pruebas PGP.....	71
Figura 2.8. Número de cepas aisladas (según género) de acuerdo con sus capacidades PGP <i>in vitro</i> .....	75

## CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS EN PLANTA PARA DETERMINAR SU CAPACIDAD COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Figura 3.1. Temperaturas y precipitaciones medias (de 1971 a 2000) y del año 2012 registradas en el observatorio de León (La Virgen del Camino).....	103
Figura 3.2. Microfotografías tomadas en los aislados de <i>G. mosseae</i> .....	109
Figura 3.3. Aplicación de la técnica del número más probable (NMP) de propágulos de hongos micorrícicos en los suelos muestreados y observación al estereoscopio de las raíces micorrizada.....	111
Figura 3.4. Comparación de plantas inoculadas con PGPR + rizobio, inoculada solo con rizobio y sin inocular.....	116
Figura 3.5. Experimento de campo en León.....	126

Figura 3.6. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes rendimiento, biomasa aérea, índice de cosecha, vainas por planta, semillas por vaina y biomasa seca de 1000 semillas, obtenidos en el experimento con alubia Riñón en campo.....138

Figura 3.7. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes N, P, K, Ca y Mg en semillas, obtenidos en el experimento con alubia Riñón en campo.....139

Figura 3.8. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes rendimiento fresco, rendimiento seco, biomasa aérea seca, índice de cosecha, frutos por planta y peso medio fresco por fruto, obtenidos en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” .....140

Figura 3.9. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes N, P, K, Ca y Mg en frutos, obtenidos en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” .....141

### **CAPÍTULO 3: BIOCONTROL**

Figura 4.1. Esquema del diseño de los ensayos de enfrentamientos duales del cultivo de *F. oxysporum* o *P. capsici* vs cepas bacterianas, en condiciones *in vitro*.....160

Figura 4.2. Enfrentamientos duales en medio PDA, pruebas de biocontrol *in vitro*.....162

Figura 4.3. Pruebas de biocontrol de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* con bacterias endofíticas en plantas de alubia en condiciones gnotobióticas.....171

Figura 4.4. Pruebas de biocontrol de *P. capsici* con bacterias endofíticas en plantas de pimiento en condiciones gnotobióticas.....175

Figura 4.5. Selección de combinaciones binarias de microorganismos para biocontrol.....177



**ANTECEDENTES**



## 1 LA ALUBIA (*Phaseolus vulgaris* L.)

La alubia, *P. vulgaris* L., pertenece a la familia Leguminosae o Fabaceae que comprende alrededor de 730 géneros y 19.400 especies, la familia más importante de plantas dicotiledóneas. Las leguminosas constituyen la segunda familia de plantas más relevante a nivel económico, solo después de la familia Poaceae, con un mercado mundial de dos billones de dólares. Incluyen variedades herbáceas anuales y leñosas perennes (Allen y Allen, 1981). El fruto de las leguminosas comestibles es una fuente vegetal de proteína. Además de su uso comestible, las leguminosas se utilizan también como forraje, abono verde y ornamentales; algunas especies se cultivan para la obtención de madera, aceites, combustibles y gomas (van Schoonhoven y Voysest, 1991).

Las leguminosas son componentes esenciales de ecosistemas naturales y de agroecosistemas. Establecen una relación simbiótica con los rizobios, bacterias pertenecientes a varios géneros, que forman nódulos en las raíces de las leguminosas en los cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Los rizobios utilizan la enzima nitrogenasa que cataliza la conversión de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4$ ), la forma de nitrógeno asimilable por las plantas para la producción de biomoléculas esenciales como aminoácidos, ácidos nucleicos y clorofila (Allen y Allen, 1981).

De acuerdo con la clasificación más ampliamente aceptada, las leguminosas se agrupan en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Faboideae o Papilionoideae.

La alubia pertenece a la subfamilia Papilionoideae. Es una planta herbácea, de ciclo anual, de autopolinización, intolerante a heladas, cultivada en zonas tropicales y templadas. Las formas cultivadas de *P. vulgaris* son plantas de porte herbáceo, de ciclo anual y con hábitos de crecimiento determinado (tipo I) o indeterminado (tipos II, III y IV), que presentan una tendencia al crecimiento trepador. Las semillas comestibles de la alubia contienen un alto porcentaje de proteína (alrededor del 22% del peso seco). Además de las semillas, el fruto, constituido por una vaina, también es comestible antes de su maduración (Debouck y Hidalgo, 1986).

### 1.1 Origen de la alubia

El origen de *P. vulgaris* se encuentra en América, concretamente a lo largo de las cordilleras de América Central y de los Andes. Existen dos centros principales de domesticación de la alubia bien diferenciados, el Mesoamericano y el Andino. El primero comprende regiones de México, Guatemala, Honduras y noroeste de

## Antecedentes

Colombia, y el Andino se localiza al sur de Perú, Bolivia y noroeste de Argentina (Gepts y Debouck, 1991).



Figura 1.1. Plantas de *P. vulgaris* L.

El cultivo de la alubia es uno de los más antiguos, los yacimientos arqueológicos en México y Suramérica indican que se cultivaba desde aproximadamente 5.000 años antes de Cristo (a.C). La selección y domesticación realizada por las culturas precolombinas distribuidas por el continente americano y su posterior distribución por el resto del mundo dio paso a una gran diversidad de variedades y nombres. Estos nombres incluyen frijol, frejol, poroto, alubia, judía, frijol, nuña, habichuela, vainita, caraota y feijão (Debouck y Hidalgo, 1986).

Con el descubrimiento de América muchos productos del nuevo mundo fueron introducidos en Europa, como el maíz, las patatas, el girasol y la alubia (Gepts y Bliss, 1988). La alubia se introdujo a la península ibérica, primero desde Centroamérica y luego desde los Andes por marineros y comerciantes, que atraídos por su color y por el fácil transporte de las semillas la consideraban una curiosidad (Santalla et al., 2002).

De acuerdo con los estudios del tipo de patrón de faseolina y la morfología de la semilla, la mayoría del germoplasma presente en Europa procede del centro de origen Andino, cuyas semillas contienen faseolina de patrón tipo T y son de mayor tamaño que las semillas de origen Mesoamericano, más redondeadas y pequeñas y con faseolina de patrón tipo S. Se cree que las líneas Mesoamericanas fueron menos populares debido a su poca adaptabilidad a los inviernos fríos y a los veranos cortos (Rodiño et al., 2010). Finalmente, se desarrollaron nuevos cultivares en la península ibérica, conteniendo una reserva genética proveniente de ambos centros de origen. Consecuentemente, el sur de Europa se considera un segundo centro de diversificación de la alubia (Santalla et al., 2002).

## 1.2 El cultivo de la alubia

La alubia se produce extensivamente en todo el mundo. Se encuentra desde los 52° N hasta los 32° S de latitud, y desde cerca del nivel del mar en Estados Unidos (EE.UU) y Europa hasta los 3.000 m en los Andes Suramericanos (van Schoonhoven y Voysest, 1991). Los sistemas de cultivo varían desde monocultivos altamente mecanizados, irrigados y fertilizados, hasta complejas asociaciones de alubias trepadoras con cereales, café y bananas. La densidad óptima de siembra varía desde solamente 6 plantas m<sup>-2</sup> (hábito de crecimiento tipo III) hasta las 48 plantas m<sup>-2</sup> (hábito de crecimiento tipo I) (Graham, 1978).

La diversidad de condiciones y variedades de *P. vulgaris* que se cultivan actualmente, hace difícil delimitar las condiciones edáficas y climatológicas aptas para esta especie. Las restricciones de productividad varían según la región y las necesidades de los productores. Para los pequeños agricultores de Latinoamérica y África la gran necesidad consiste en estabilizar la cosecha, ya que la producción se realiza con frecuencia bajo condiciones marginales y elementos técnicos limitados. Para los productores a gran escala, más comunes en EE.UU y Europa, la gran necesidad radica en mejorar la cosecha en sí misma (Graham y Ranalli, 1997).

El laboreo, la fertilización, el encalado y la aplicación de estiércol, son parte de las prácticas comúnmente realizadas en el cultivo de la alubia (van Schoonhoven y Voysest, 1991). Una adecuada nutrición de P, es esencial para un crecimiento vigoroso y una adecuada fijación de N (van Schoonhoven y Voysest, 1991; Graham y Ranalli, 1997).

La alubia es especialmente sensible al estrés por sequía y calor. Alrededor del 60% de la producción de alubia en países en vías de desarrollo, ocurre bajo condiciones de estrés hídrico por sequía; esto sucede en México, África, regiones de Centroamérica y de Brasil. La falta de agua, particularmente durante la floración,

provoca la muerte de flores y el aborto de frutos (vainas). En EE.UU y Europa el manejo de agua es un aspecto crítico en la producción, donde se ha observado que al reponer gran parte de las pérdidas de agua por evapotranspiración se ha obtenido una mejora considerable en el rendimiento. Por el contrario, un exceso de agua puede favorecer la aparición de enfermedades relacionadas con la podredumbre de la raíz. El desarrollo reproductivo de la alubia es sensible a las altas temperaturas, que afecta de forma negativa a la interacción polen-estigma, a la fertilización y a la germinación del polen (Graham y Ranalli, 1997).

La incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos de alubia es mayor en zonas tropicales que en zonas templadas. Las altas temperaturas y elevada humedad favorecen la reproducción y diversidad de patógenos y plagas; además, los pequeños agricultores de Latinoamérica y África cuentan con menores recursos para el combate de plagas y enfermedades. Esta situación, sumada al hecho de que estos pequeños productores cuentan con pequeñas áreas de producción que impiden la rotación de cultivos y que además realizan de 2 a 3 ciclos de producción al año, hace que el inóculo primario permanezca continuamente en las fincas (van Schoonhoven y Voysest, 1991).

Por el contrario, en Europa y EE.UU, el uso indiscriminado de agroquímicos en grandes extensiones de monocultivo, provoca problemas ambientales de contaminación y resistencia. Aparte, existen plagas y enfermedades cuyo control químico no es efectivo (van Schoonhoven & Voysest, 1991).

Entre los patógenos de mayor importancia se encuentran hongos y bacterias. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, causante de la marchitez por Fusarium y *F. solani*, causante de la podredumbre seca, son dos de las principales enfermedades causadas por hongos de suelo. Otros patógenos de importancia son *Colletotrichum lindemuthianum* causante de la antracnosis, *Uromyces appendiculatus* causante de la roya, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* causante de la quema bacteriana de la alubia y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* causante de la grasa.

Otros agentes causantes de enfermedades son el virus del mosaico amarillo de la alubia (BYMV) y el virus del mosaico común de la alubia (BCMV). Existen varios patógenos de suelo que causan podredumbre en la raíz y que afectan la semilla y la emergencia de plántulas, entre ellos *Rhizoctonia solani* y *Erwinia carotovora* (Graham y Ranalli, 1997). También las plagas son importantes en el cultivo de la alubia. La araña roja y blanca, la mosca de los sembrados, pulgones, trips, minadores, orugas y nematodos pueden disminuir el rendimiento del cultivo (Graham & Ranalli, 1997).



Figura 1.2. Cultivo de alubia en Sueros de Cepeda. León. Castilla y León.

### 1.3 Producción de alubia y su importancia.

La alubia es la leguminosa comestible más importante a nivel mundial. Se consume como grano maduro, semilla inmadura y como producto hortícola (hojas y vainas). Es una importante fuente de proteínas, vitaminas (ácido fólico) y minerales (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn y Zn), especialmente en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, África y Asia (Broughton et al., 2003).

Asimismo, en países desarrollados los beneficios nutricionales del consumo de alubia en la dieta humana la convierten en un producto recomendado en la dieta de personas con problemas cardiovasculares y diabetes (Bennink, 2002).

Según La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción mundial de alubia para grano en el año 2012 fue de 23,6 millones de toneladas. De acuerdo con estos datos, en promedio desde el 2008 hasta el 2012, Asia es el continente con mayor producción de alubia para grano, con un 47% de la producción, seguido por el continente americano con un 32%, África con un 19% y Europa solamente con un 2%. Los 4 mayores productores son India, Myanmar, Brasil y China Continental (Figura 1.3).

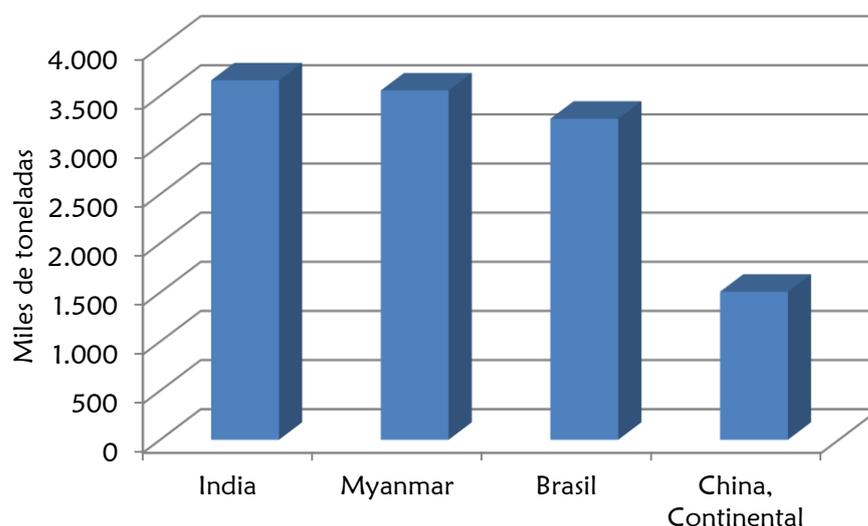


Figura 1.3. Promedio de producción entre los años 2008 y 2012 de los cuatro países mayores productores de alubia para grano (FAOStat.2012).

En España, la producción total en el año 2011 fue de 11.701 toneladas (t). La producción de alubia para grano en España está repartida por prácticamente todo el territorio, siendo Castilla y León la comunidad autónoma con la mayor producción, alrededor del 50% del total del país y dentro de esta comunidad, la provincia de León concentra el 87% de la producción, lo que representa el 43% de la totalidad de la producción española con 5.078 t (Tabla 1.1).

El comportamiento del cultivo de alubia para grano en España muestra una caída generalizada de la superficie y la producción a partir del año 2001, pasando de 15.000 a unas 11.000 t. Sin embargo, ocurre lo contrario con el rendimiento, que ha experimentado un aumento de 4 qm (quintales métricos) /ha desde inicios del siglo XXI, lo que compensa de alguna forma la caída en la producción (Figura 1.4).

La disminución de la rentabilidad debido a las importaciones, a precios más reducidos, problemas fitosanitarios, reconversión del campo que deja sin mano de obra y especialmente la no inclusión de este cultivo en las ayudas a cultivos herbáceos de la Política Agraria Comunitaria (PAC) de la Unión Europea (Reinoso et al., 2007), podrían ser las causas de la disminución de superficie y producción de alubia en España.

Tabla 1.1. Superficie, rendimiento y producción de alubia seca total y por comunidades autónomas en España en el año 2011, según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) (MAGRAMA, 2013a).

Comunidades	Superficie (hectáreas)	Rendimiento (kg/ha)	Producción de grano (toneladas)
GALICIA	1.766	2.897	2.555
P. DE ASTURIAS	1.029	2.141	691
CANTABRIA	9	1.050	9
PAÍS VASCO	664	2.438	694
NAVARRA	304	3.772	821
LA RIOJA	114	1.850	211
ARAGÓN	4	4.300	9
CATALUÑA	208	1.862	257
BALEARES	–	–	–
CASTILLA Y LEÓN	2.551	4.154	6.060
<i>Ávila</i>	<i>187</i>	<i>2.500</i>	<i>468</i>
<i>Burgos</i>	<i>27</i>	<i>2.200</i>	<i>59</i>
<i>León</i>	<i>2.116</i>	<i>2.400</i>	<i>5.078</i>
<i>Palencia</i>	<i>66</i>	<i>4.000</i>	<i>132</i>
<i>Salamanca</i>	<i>29</i>	<i>1.850</i>	<i>54</i>
<i>Segovia</i>	<i>30</i>	<i>4.000</i>	<i>73</i>
<i>Soria</i>	<i>2</i>	<i>1.000</i>	<i>2</i>
<i>Valladolid</i>	<i>43</i>	<i>4.500</i>	<i>117</i>
<i>Zamora</i>	<i>51</i>	<i>1.510</i>	<i>77</i>
MADRID	–	–	–
CASTILLA–LA MANCHA	75	2.243	118
C. VALENCIANA	12	2.313	14
R. DE MURCIA	3	1.900	6
EXTREMADURA	16	2.060	33
ANDALUCÍA	111	2.029	108
CANARIAS	123	1.640	115
ESPAÑA	6.989	3.358	11.701

#### 1.4 La alubia en León y la IGP

La importancia de la alubia en León, se remonta al siglo XVI. Existen registros que reflejan la importancia y la existencia de este grano en la localidad. En 1570 hubo

transacciones en los famosos mercados de Medina del Campo, de alubias de La Bañeza, que eran llevadas allí en exclusiva por labradores de la comarca. El Catastro de Ensenada, en el año 1752, refiere que en La Bañeza se celebraba un mercado todos los sábados del año y cita las alubias entre las mercaderías con que allí se comerciaba. En 1799, en un censo se informa sobre el cultivo en la provincia de León. En una guía general de la provincia de León de 1928 se indica: “las alubias, que se exportan en grandes cantidades, dan fama a esta región” (Rubio Pérez, 1987).

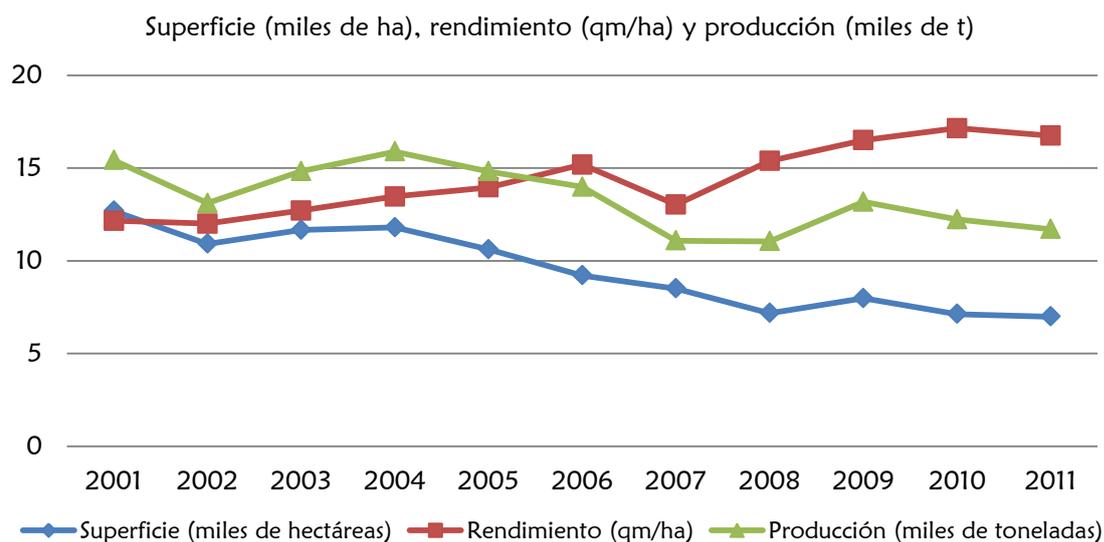


Figura 1.4. Evolución de superficie, rendimiento y producción de alubia para grano en España 2001-20011 (MAGRAMA, 2013a).

La importancia histórica de León como zona productora de alubia y la diferenciación a nivel de variedades de alubias cultivadas, han sido fundamentales para la obtención de la marca de calidad Indicación Geográfica Protegida (IGP) "Alubia de La Bañeza-León" y ha contribuido a la ralentización en el descenso de la superficie cultivada en dicha IGP. La IGP fue reconocida en 2005, mediante la aplicación del Reglamento por parte del Consejo Regulador (España, 2006).

Las IGP y las Denominaciones de Origen Protegido (DOP), constituyen el sistema utilizado en España para el reconocimiento de una calidad diferenciada, consecuencia de características propias y diferenciales, debidas al medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos, y a la influencia del factor humano que participa en las mismas (Consejo de las Comunidades Europeas, 2006).

Las variedades locales de alubia: “Canela”, de forma arriñonada alargada y color canela uniforme; “Plancheta”, de forma ovalada y color blanco; “Riñón menudo”, de forma riñón oval y color blanco vetado y “Pinta”, de forma redondeada, color canela con pintas granates, son las que están incluidas dentro de la IGP "Alubia de La Bañeza-León" (Figura 5.1), (España, 2006).



Figura 1.5. Variedades de Alubia de la IGP "Alubia de La Bañeza-León". (Consejo Regulador IGP Alubia de la Bañeza-León, 2005).

La calidad de estas variedades está avalada por una tipificación estricta del ecotipo y por la mejora en el cultivo, realizado a partir de una práctica agrícola moderna y una adecuada recolección para obtener un perfecto secado y salvaguardar sus cualidades nutritivas y organolépticas (España, 2006).

Estas variedades locales son, además, de especial interés para el mantenimiento de recursos fitogenéticos, por la calidad del producto junto con la adaptación a las condiciones ambientales locales (Casquero et al., 2006). Además, se ha realizado una caracterización del germoplasma existente y una selección genealógica adecuando las cualidades de grano a la demanda del mercado (De Ron et al., 2004; Casquero et al., 2006).

La zona de producción agrícola de la IGP, de 5.456 km<sup>2</sup>, se encuadra en 98 municipios de la provincia de León pertenecientes a las comarcas agrarias de Astorga, El Páramo, Esla-Campos, La Bañeza, La Cabrera y Tierras de León, así como en 20 municipios de la comarca de Benavente-Los Valles, en la provincia de Zamora, colindante con la anterior (España, 2006).

Las características climáticas son las propias de transición entre las zonas que las rodean, con claras diferencias en los regímenes de temperatura y humedad respecto a la zona exterior este y en el régimen de humedad con las zonas exteriores norte y oeste. El índice medio de precipitaciones durante la época de cultivo de la alubia es el adecuado para el correcto desarrollo de la planta de alubia, ya que éste se cultiva en régimen de regadío o en secanos muy frescos (España, 2006).

## 2 EL PIMIENTO (*Capsicum annum* L.)

El pimiento, *C. annum*, pertenece a la familia Solanaceae, formada por unos 90 géneros y entre 3.000 y 4.000 especies (Viñals et al., 1996). Esta familia contiene géneros de gran importancia económica por su uso como plantas medicinales, productos comestibles u ornamentales. Las patatas, tomates y berenjenas pertenecientes al género *Solanum*, el tabaco perteneciente al género *Nicotiana*, y las petunias pertenecientes al género *Petunia*, se encuentran dentro de la familia de las solanáceas (Olmstead et al., 2008).

La familia Solanaceae se divide en 2 subfamilias: Solanoideae, a la cual pertenece el género *Capsicum* y Cestroideae. El género *Capsicum* engloba a todas las formas de pimiento, ají o chile cultivadas actualmente (Viñals et al., 1996), comprende alrededor de 25 especies, de las cuales 5 son domesticadas y son las más importantes a nivel económico, *C. annum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz & Pav. y *C. chinense* Jacq. (Perry et al., 2007).

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja debido a la gran variabilidad de formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación (Viñals et al., 1996).

El complejo *C. annum* que incluye las tres especies próximas, *C. annum*, *C. frutescens* y *C. chinense*, comparte el mismo acervo genético ancestral; siendo el más extendido y cultivado tanto en América como en el resto del mundo. *C. annum* incluye la mayoría de los pimientos o chiles mexicanos, los pimientos picantes de África y Asia y varios cultivares de pimiento dulce en zonas templadas. Sin embargo, no se adapta bien a las tierras bajas de los trópicos por lo que se reemplazó por *C. chinense* y *C. frutescens*. Esta última especie también se cultiva en África y Asia para su uso como especia, utilizándose el fruto y el extracto de oleoresina e incluye a la variedad chile Tabasco. Por otra parte, los frutos de *C. chinense* tienen un olor y sabor particular, incluye las variedades Scotch Bonnet y Habanero. El interés creciente en la comida étnica está llevando a un aumento en la venta de esta especie en países desarrollados. Las dos especies restantes se

encuentran predominantemente en Latinoamérica. *C. baccatum* incluye los chiles picantes frescos y secos más comunes de los países Andinos (ajís) y *C. pubescens*, también de zonas altas Andinas, de cáscara delgada y jugosa, se utiliza siempre como fruto fresco, en Perú se le llama rocoto y en Bolivia locoto (Pickersgill, 1997).

La terminología utilizada para designar a los miembros del género *Capsicum* es confusa ya que según la región se les puede llamar de distinta forma, de hecho existen más de 200 nombres comunes para el pimiento, entre ellos, chile, chili, paprika, ají, cayena, chiltepín, etc (Zhigila et al., 2014).

Etimológicamente existe un origen para los principales nombres otorgados en la cultura occidental. La palabra chile es una variación de chil, derivado del Nahuatl, dialecto azteca. La palabra ají es una variación de axí, del arahuaco, dialecto de los tahínos, aborígenes habitantes de las Antillas. Por su parte, la palabra pimiento procede de la palabra pimienta; los conquistadores encontraron semejanza de uso del ají o chile con el uso del pimiento que se conocía en Europa, la pimienta (*Piper nigrum*), que no tenía nada que ver con el ají, así entonces el ají o chile adoptó en España el nombre de pimiento (De, 2004).

La planta de pimiento es una herbácea, de ciclo anual, de crecimiento limitado, y con altura y forma de desarrollo muy variables en función del cultivar y de las condiciones de cultivo. El fruto es una baya hueca, con la superficie lisa y brillante, de color y forma muy variables y característicos del cultivar (Viñals et al., 1996).

## 2.1 Origen del pimiento

Todas las especies de *Capsicum*, proceden de América. La única especie que no se consideraba de origen americano, *C. anomalum* de origen asiático, ha pasado a formar parte de un nuevo género *Tubocapsicum* (D'Arcy et al., 2001).

La distribución precolombina de *Capsicum* se extendió probablemente desde el borde más meridional de EE.UU. a la zona templada cálida del sur de Suramérica. Las especies silvestres y domesticadas de *Capsicum*, se dividen en 3 grupos, uno de flores púrpura y dos de flores blancas. Existe una sola especie silvestre *C. chacoense* que no se ubica en ninguno de estos grupos. El grupo I de flores púrpura correspondiente a *C. pubescens* se originó en las tierras altas de los Andes y en Centro América y México en altitudes entre los 1.200 y 3.000 msnm. El grupo II de flores blancas, *C. baccatum*, es característico de hábitats relativamente más secos y parece haberse originado en la región sur central de Bolivia. Por último, el grupo III, grupo de *C. annuum*, asociado a hábitats más húmedos, se originó en tierras bajas de Mesoamérica (sur de América del Norte y Centroamérica) (McLeod

et al., 1982). El posterior proceso de domesticación parece que ocurrió independientemente en varias áreas, empleándose diferentes especies silvestres. Actualmente se cree que *C. pubescens* y *C. baccatum* fueron domesticadas en Bolivia, y el complejo *annuum* presenta al menos dos centros de domesticación, un tipo *C. annum* en México y un tipo *C. chinense* en la Amazonia (Chacón et al., 2005).

La evidencia arqueológica en México indica que los aborígenes utilizaban el pimiento como parte de una compleja y sofisticada dieta, posiblemente desde el 8.000 a.C. (Matheny y Gurr, 1983). Después de la conquista, el pimiento se expandió por Europa con gran rapidez, quizás por su uso como especie análoga a la pimienta. Los conquistadores cargaban barcos de pimiento para reemplazar el uso de la pimienta en España, que en ese momento, como otras especias, tenía un precio desorbitado. Además, al contrario que la pimienta, el pimiento podía ser cultivado en las condiciones agroclimáticas de España y desde la península ibérica se extendió al resto de Europa. Los portugueses contribuyeron de forma decisiva, mediante sus colonias (India, Angola y Mozambique), a la expansión del pimiento y por su parte los turcos con grandes rutas de comercialización también hicieron lo mismo (Viñals et al., 1996).

## 2.2 El cultivo del pimiento

El pimiento se cultiva en prácticamente todas las zonas tropicales y templadas del mundo. La gran mayoría de cultivares de pimiento producidos en España corresponden a *C. annum*. Las variedades y cultivares de *C. annum* se clasifican según la forma de sus frutos.

En general, el pimiento es exigente en cuanto a condiciones agroclimáticas. Las temperaturas inferiores a 15 °C retrasan o bloquean el desarrollo. Las temperaturas diurnas óptimas se encuentran entre los 22 y 23 °C y las nocturnas entre 18 y 20 °C. Las altas temperaturas, especialmente asociadas a humedad relativa baja conducen a la caída de flores y frutos recién cuajados, siendo éstos más resistentes cuando se encuentran en estados más avanzados de desarrollo. Prefiere terrenos profundos, ricos en materia orgánica, sueltos, bien aireados y permeables, en donde no exista estancamiento de agua, ya que el exceso de agua en la raíz produce asfixia radicular y la marchitez de la planta, síntoma más bien típico de sequía, y se adapta bien a un rango de pH entre 5,5 y 7,0 (Viñals et al., 1996).

Entre las labores de preparación del terreno para el cultivo están el laboreo previo para eliminar rastrojos de cosechas anteriores y semillas de plantas arvenses, el

gradeo y el abonado. La siembra puede ser directa o por trasplante que es el método tradicional (Viñals et al., 1996).

En cuanto a los problemas fitosanitarios, existen varias plagas y enfermedades que atacan a la planta de pimiento. Entre las plagas de insectos se encuentran los áfidos o pulgones, como el áfido del melón y el áfido verde, ácaros como la araña roja, gusanos barrenadores, minadores, moscas blancas, trips y nematodos. Las enfermedades más comunes son la mancha bacteriana producida por *X. campestris* pv. *vesicatoria*, enfermedades fúngicas como antracnosis producida por *Colletotrichum* spp., moho gris y moho blanco causados por *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* y la marchitez del pimiento causada por el hongo de suelo *Phytophthora capsici*. Por último, existen virosis importantes que atacan al pimiento como el virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus moteado del pimiento (PMV) y el virus del bronceado el tomate (TSWV), entre otros (Pernezny et al., 2003).

### 2.3 Importancia y producción del pimiento

El pimiento es uno de los productos hortícolas más importantes en el mundo, esencial en la dieta de países tropicales, pero se cultiva en regiones tropicales y subtropicales. El fruto es una fuente natural de antioxidantes (vitamina C y E y carotenoides) que ayuda a contrarrestar los efectos del envejecimiento. El fruto del pimiento picante se ha utilizado históricamente en medicina. Es fuente de capsaicina, una oleorresina (el compuesto predominante en los pimientos picantes) que induce la disminución de neurotransmisores de las terminales nerviosas sensoriales y que consecuentemente alivia el dolor, por lo que se utiliza en cremas para el alivio el dolor muscular (Palevitch y Craker, 1996).

El pimiento que se cultiva tiene básicamente 4 usos: consumo fresco, desecación para fabricación de pimentón y oleorresinas para la industria, que se obtiene de la molienda de la cáscara; fabricación de conservas y uso de variedades picantes como especia (Vallespir et al., 2010).



Figura 1.6. Plantas de pimiento.

Las superficies dedicadas al cultivo de los distintos tipos varietales cambia considerablemente en cada país, en función de los usos y costumbres, volumen y destino de las exportaciones, dominando en los países africanos y asiáticos los tipos picantes, en los países de Europa occidental los tipos dulces, en los de Europa oriental los tipos paprika o para pimentón y en América ambos tipos: dulces y picantes (Marín-Rodríguez, 2007).

La producción mundial de pimiento para el año 2012 fue de 32 millones de toneladas (FAOStat, 2012). Asia lideró la producción con un 68,5% de la producción, seguido por América con un 13%, África con un 9,3%, Europa con un 9,1% y Oceanía con un 0,2%. Considerando las producciones medias del periodo 2008-2014, China es el principal país productor, seguido de México, Turquía e Indonesia (Figura 1.7).

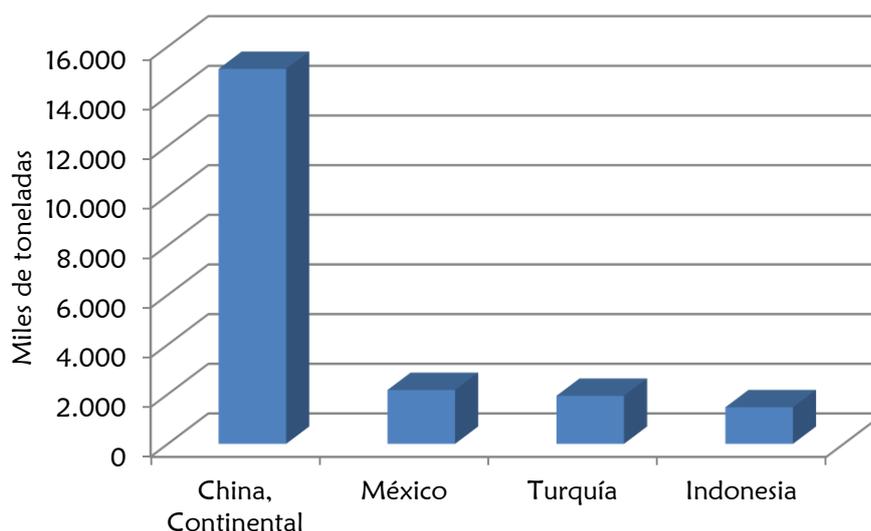


Figura 1.7. Promedio de producción entre los años 2008 y 2012 de los cuatro países mayores productores de pimienta (FAOStat, 2012).

La demanda de pimientos frescos durante todo el año en los mercados europeos, ha crecido espectacularmente y ha tenido como consecuencia el desarrollo del cultivo en invernaderos en todo el litoral mediterráneo español (Figura 1.9). España se ha convertido en el principal exportador hacia el mercado europeo, que demanda frutos no excesivamente grandes, rectangulares largos y de forma cuadrada en rojo (mercado francés, suizo y sueco), amarillo y verde (mercado alemán o portugués) y en envase de malla tricolor principalmente para todo el centro y norte europeo (Namesny, 2010).

Según datos del MAGRAMA (2013b), desde el año 2001 hasta el año 2011, se registra un leve aumento en el rendimiento pasando de las 430.000 t en 2001 a 520.000 t en 2011. Por otro lado, tanto la superficie cultivada como la producción presentan un leve descenso, pasando de 22.700 ha a 17.600 ha y de 980.000 t a 918.000 t, respectivamente entre los años 2001 y 2011 (Figura 1.8).

La producción total de pimientos en España para el año 2011 fue de 918.549 t. Como se observa en la tabla 1.2 y en la figura 1.9, Andalucía fue la comunidad autónoma que lideró la producción de pimientos, con 572.218 t, lo que representa un 63% de la producción nacional, siendo las provincias de Almería y Murcia las mayores productoras. Por su parte, Castilla y León produjo apenas 6.162 t de pimientos de las cuales León produjo 2.585 t, seguida de Zamora con 1.610 t y Valladolid con 760 t. León es la provincia de Castilla y León que presentó la mayor producción de pimientos y posee La IGP Pimiento de Fresno-Benavente.

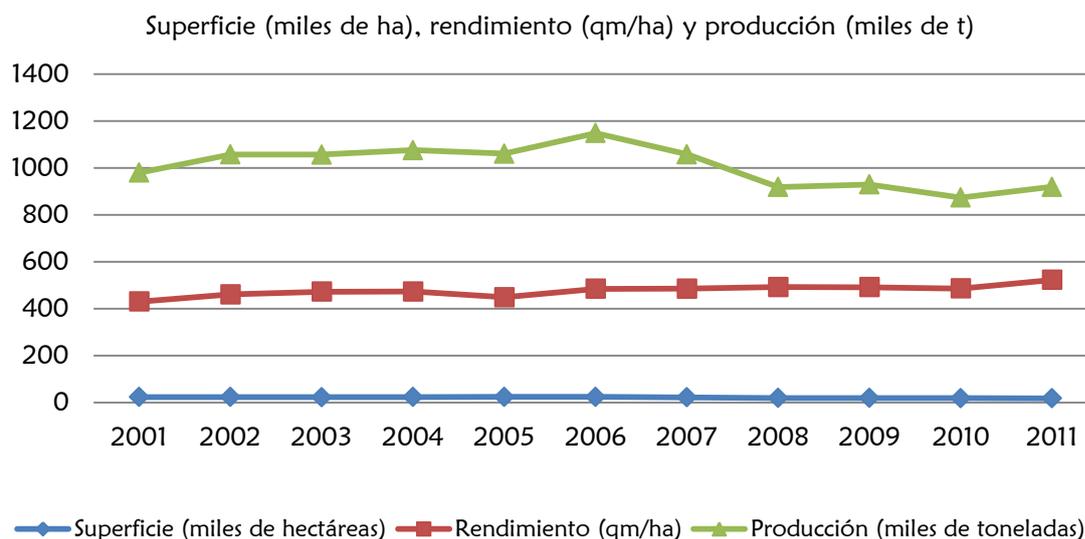


Figura 1.8. Evolución de superficie, rendimiento y producción de pimiento fresco en España 2001-2011 (MAGRAMA 2013b).

## 2.4 El pimiento en León y la IGP.

Los primeros registros de la presencia del pimiento en las mesas leoneses datan del siglo XVIII, más tarde en 1914, en una publicación del Ministerio de Agricultura, se indica que la variedad de pimientos más generalizada es la conocida como morro de vaca, y cita a Benavente, junto con Zamora y Toro, como las únicas poblaciones zamoranas donde hay comercio de productos hortícolas (España, 2009).

El tratado agronómico “El cultivo de pimientos, chiles y ajíes”, publicado por Mundi-Prensa (1996), recoge que la variedad morro de vaca, según localidades y selecciones puede recibir distintos nombres, y entre ellos destaca la denominación “de Fresno” (Viñals et al., 1996).

La IGP Pimiento de Fresno-Benavente se refiere al Pimiento “de Fresno”. Es un ecotipo local especialmente adaptado a la zona de producción y que se manifiesta diferente a otros ecotipos cultivados en otras zonas. En la zona de producción manifiestan mayor grosor de la carne, mayor jugosidad, menor amargor, menor dureza y menos restos de piel. Estas características están relacionadas con los bajos niveles de materia orgánica del suelo y con las texturas de suelos existentes en la zona de producción. La tradición histórica en el cultivo del pimiento de la zona de producción garantiza una cuidada selección local de las mejores plantas del ecotipo “de Fresno” para la obtención de simiente, la determinación de las

mejores parcelas para la producción de pimientos de calidad, experiencia en las labores de cultivo y cuidado en el manejo de los frutos (España, 2009).

Tabla 1.2. Superficie, rendimiento y producción de pimiento por comunidades autónomas en España en el año 2011 (MAGRAMA, 2013b).

Comunidades	Superficie (hectáreas)	Rendimiento(kg/ha)	Producción (toneladas)
GALICIA	1.337	117.050	70.259
P. DE ASTURIAS	18	60.000	260
CANTABRIA	10	16.000	160
PAÍS VASCO	299	56.271	4.915
NAVARRA	776	46.997	19.876
LA RIOJA	172	67.000	4.351
ARAGÓN	178	40.685	2.449
CATALUÑA	396	66.104	9.213
BALEARES	87	64.300	2.548
CASTILLA Y LEÓN	282	99.846	6.162
<i>Ávila</i>	<i>21</i>	<i>16.000</i>	<i>336</i>
<i>Burgos</i>	<i>3</i>	<i>25.000</i>	<i>75</i>
<i>León</i>	<i>110</i>	<i>77.700</i>	<i>2.585</i>
<i>Palencia</i>	<i>8</i>	<i>12.667</i>	<i>56</i>
<i>Salamanca</i>	<i>8</i>	<i>15.000</i>	<i>120</i>
<i>Segovia</i>	<i>31</i>	<i>20.000</i>	<i>620</i>
<i>Soria</i>	–	–	–
<i>Valladolid</i>	<i>38</i>	<i>20.000</i>	<i>760</i>
<i>Zamora</i>	<i>63</i>	<i>110.000</i>	<i>1.610</i>
MADRID	30	25.000	750
CASTILLA–LA MANCHA	1.238	73.076	46.563
C. VALENCIANA	654	100.102	38.549
R. DE MURCIA	1.334	132.000	110.968
EXTREMADURA	471	284.891	19.230
ANDALUCÍA	10.148	104.413	572.218
CANARIAS	165	131.731	10.078
ESPAÑA	17.595	108.647	918.549

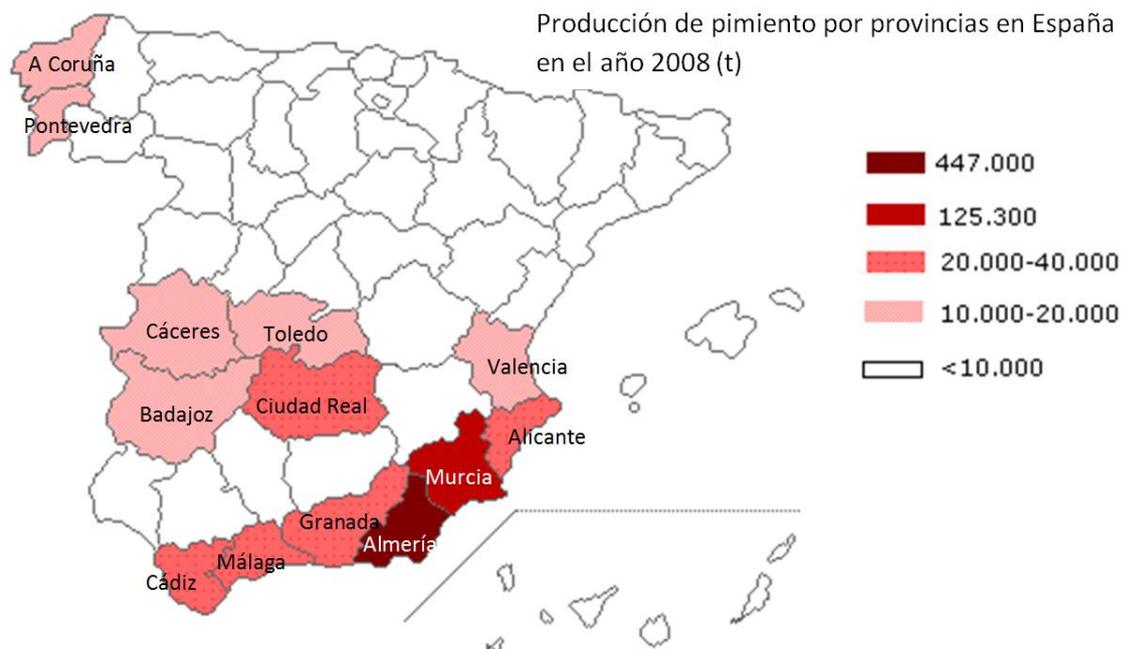


Figura 1.9. Producción de pimienta por provincias en España (toneladas) en el año 2008 (MAGRAMA, s.f)

La zona de producción agrícola se sitúa al noroeste de Castilla y León, ocupando 33 municipios del sureste de la provincia de León, 55 municipios del norte de Zamora y un municipio de Valladolid (España, 2009).

La reputación actual de la IGP, viene avalada por la repercusión que tienen, tanto las Ferias del Pimiento, que se celebran anualmente el último fin de semana de septiembre, en Fresno de la Vega y en Benavente- y que están incluidas en el calendario ferial oficial de Castilla y León-, como la Cofradía del Pimiento de Fresno (España, 2009).

Asimismo, existe otra IGP de pimiento que pertenece a la provincia de León: “Pimiento asado del Bierzo”. El producto a proteger es el fruto de la planta de pimiento de ecotipo Bierzo, destinado a consumo humano y que se presenta asado y envasado. El pimiento pertenece al ecotipo del Bierzo, es un conjunto de individuos que presentando características genéticas idénticas a las de la variedad a la que pertenecen, están adaptados a las condiciones de la comarca del Bierzo, presentando diferencias morfológicas y fisiológicas debidas al medio, y precisamente por ello, reciben como sobrenombre «del Bierzo» (España, 2010).



Figura 1.10. Frutos de pimiento morrón ecotipo “de Fresno”.

### 3 USO DE FERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA

#### 3.1 Escenario mundial.

Entre los años 1960 y 1970, existía un gran debate sobre cómo alimentar a una creciente población mundial. La solución: aumentar la producción per cápita de alimentos. Así nació la revolución verde; consistió en el desarrollo de variedades mejoradas, principalmente de cereales como el trigo, el arroz y el maíz, resistentes a plagas y enfermedades y con rendimientos de 2 a 3 veces mayores que las variedades tradicionales. Al mismo tiempo, se destinaron grandes áreas de cultivo para la siembra, dando paso a monocultivos extensivos altamente dependientes de insumos como agua, fertilizantes y pesticidas (Conway y Barbier, 2013).

Las consecuencias negativas de estos 50 años de producción intensiva incluyen contaminación de mantos acuíferos, liberación de gases de efecto invernadero, pérdida de diversidad genética y la eutrofización de ríos, lagos y de ecosistemas marinos costeros. Aunado a esto, la erosión y pérdida de fertilidad del suelo, el incremento de incidencia de enfermedades y el alto consumo de energía y de insumos agrícolas hace pensar sobre la sostenibilidad de la agricultura intensiva. En consecuencia, la búsqueda de prácticas que proporcionen rendimientos

comparables con los obtenidos por la agricultura intensiva pero con menos costos ambientales es imprescindible (Tilman, 1998).

Por otra parte, actualmente mil millones de personas se encuentran en estado de desnutrición (Naciones Unidas, 2010) y la FAO estima que la producción mundial de alimentos debe incrementarse en un 70% para el 2050 con el fin de alimentar a la población mundial (FAO, 2009). Este escenario supone un aumento en el uso de los recursos en la agricultura, principalmente de agua, tierra y fertilizantes, por lo que constituye un punto de especial interés para los investigadores (Odegard y van der Voet, 2014).

### 3.2 Los fertilizantes.

Con el objetivo de aumentar el rendimiento de los cultivos, la aplicación de fertilizantes es una actividad agrícola común en prácticamente todos los agroecosistemas. El consumo global de fertilizantes ha ido en aumento desde la revolución verde y entre los años 2010 y 2011 se estimó en 173 millones de toneladas, siendo los fertilizantes a base de nitrógeno mineral los más consumidos (63%), seguidos por los fertilizantes a base de fósforo (23%) y luego los potásicos (16%). La úrea es el fertilizante nitrogenado más popular, con alrededor del 56% del mercado mundial (International Fertilizer Industry Association, 2013).

#### 3.2.1 El nitrógeno.

El N es el elemento más abundante en el planeta pero debido a su poca disponibilidad para las plantas es el elemento crítico para su crecimiento. El nitrógeno atmosférico,  $N_2$ , es la forma más abundante, sin embargo las plantas no pueden incorporarlo en esta forma. Las plantas asimilan el N en forma de iones nitrato ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ) que forma parte de aminoácidos, moléculas orgánicas que constituyen las proteínas, que son a su vez moléculas esenciales que participan en todos los procesos vitales de los seres vivos.

La producción de alimentos ricos en proteínas y de alta calidad es extremadamente dependiente de la disponibilidad de suficiente nitrógeno. Las plantas lo obtienen principalmente de dos fuentes: del suelo, a través de mineralización de materia orgánica, fertilizantes químicos o abonos, y de la atmósfera, a través de la fijación de N llevada a cabo en simbiosis con leguminosas por especies de bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Vance, 1998).

También existe una pequeña fracción de N fijado por bacterias de vida libre (Dobbelaere et al., 2003).

Todas las necesidades de N requeridas por los seres humanos se obtienen directa o indirectamente de las plantas (Vance, 2001). Sin embargo, la obtención de rendimientos más altos debido a las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados en los cultivos, ha conducido a un mal manejo de estas aplicaciones, convirtiéndolas en un problema. La agricultura intensiva incorpora cantidades excesivas de N y esto repercute directamente sobre el medio ambiente y la salud de los seres humanos.

Por un lado, el proceso de fabricación de fertilizantes nitrogenados es altamente costoso y dependiente de fuentes no renovables de combustibles fósiles como lo es el gas natural (Galloway et al., 1995).

Por otro lado, como se mencionó en el párrafo anterior, las cantidades excesivas de N aplicadas en la agricultura intensiva hacen que la mayor parte del N aplicado permanezca en el suelo sin ser absorbido por la planta. Por ejemplo, la eficiencia de absorción de N de los cultivos de grano ronda el 50% (Smil, 1999), por lo que el 50% restante se queda en el suelo. La acción nitrificante y desnitrificante de los microorganismos sobre este N restante produce a partir de los suelos agrícolas altas emisiones de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y de óxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}$ ), que es un gas invernadero que contribuye al calentamiento global. Los nitratos y nitritos entran rápidamente a las masas de agua superficiales y en nacientes subterráneas por escorrentía y lixiviación, contaminándolas y provocando problemas como la eutrofización (excesiva presencia de nutrientes) y la hipoxia (Galloway et al., 1995). Asimismo, la presencia de nitratos en el agua potable se ha relacionado con diversas enfermedades respiratorias, sanguíneas y cáncer (De Felipe, 2006). Consecuentemente el desarrollo de estrategias que mejoren la eficiencia de absorción del N por parte de los cultivos y la aplicación de fertilizantes nitrogenados, así como el desarrollo de nuevas fuentes de N, son tareas necesarias para la sostenibilidad del medio ambiente y de los seres vivos del planeta.

### **3.2.2 El fósforo.**

El fósforo es el segundo elemento limitante, después del N, para el crecimiento de las plantas (Bielecki, 1973). La mayor parte del fósforo presente en el suelo no está disponible para las plantas porque forma complejos insolubles con cationes como el Fe, Al y Ca, lo que conduce a la precipitación y consiguiente inmovilización de grandes cantidades del P añadido como fertilizante, por lo que suele aplicarse en

exceso para contrarrestar dicho fenómeno (Barlóg & Grzebisz, 2004). Al igual que en el caso del N, la escorrentía en los suelos cargados de P provoca eutrofización e hipoxia en lagos y estuarios marinos. Además de las razones ambientales, un hecho importante es que se estima que las baratas reservas de roca fosfórica se agotarán en 60 a 80 años (Runge-Metzger, 1995). Por lo tanto, es importante el estudio y aplicación de mecanismos que aumenten la eficiencia en la toma de P, ya sea por parte de las plantas o por parte de los microorganismos presentes en el suelo.

### **3.3 Fitosanitarios.**

Los productos fitosanitarios junto con los fertilizantes contribuyen a aumentar la productividad y la protección de cultivos y su uso, al igual que el de los fertilizantes, se ha visto incrementado en los últimos 50 años (Maroni et al., 2006). Entre los principales fitosanitarios utilizados se encuentra los herbicidas, insecticidas y fungicidas. Según la Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (2012), a nivel mundial, las ventas de fitosanitarios alcanzaron en 2012 los 47.255 millones de dólares.

Las altas concentraciones de plaguicidas aplicadas, el aumento en la frecuencia de aplicación y la falta de rotación de grupos de sustancias activas, ha convertido el uso de fitosanitarios en un problema para el ambiente y para la salud humana. Los riesgos son mayores en países en vías de desarrollo, en donde se utilizan en mayores cantidades y bajo escasas medidas de seguridad, y muchas veces, pesticidas altamente peligrosos, que incluso se han dejado de aplicar en países desarrollados.

Los daños en humanos, ya sea por exposición directa o por ingesta de alimentos o agua con residuos de pesticidas, incluyen intoxicaciones agudas, y enfermedades como cáncer y efectos adversos en la reproducción (Maroni et al., 2006).

El impacto ambiental del uso de fitosanitarios comprende la destrucción de enemigos naturales, competidores, parásitos y depredadores debido al uso de insecticidas y fungicidas de amplio espectro, que no solo eliminan las plagas blanco, sino también insectos y microorganismos presentes en el agroecosistema. Los herbicidas eliminan malezas que sirven de refugio a enemigos naturales y que evitan la erosión del suelo. Algunos fitosanitarios, en particular los insecticidas, afectan animales como aves y peces (Aktar et al., 2009).

La persistencia en el suelo y la movilidad de los fitosanitarios y productos secundarios de su descomposición, los convierte en contaminantes de suelo y de fuentes subterráneas y superficiales de agua, que al igual que los fertilizantes, alcanzan por lixiviación y escorrentía. Otro de los problemas relacionados con la

utilización de pesticidas es la creación de resistencia en insectos, hongos y bacterias, debido a la poca rotación de grupos o familias de sustancias activas (Aktar et al., 2009).

En favor de alcanzar una producción sostenible en la agricultura global, que no sólo logre rendimientos capaces de alimentar a la población, sino que también sea respetuosa con los recursos ambientales y humanos, uno de los mayores retos consiste en la búsqueda de estrategias alternativas al uso de pesticidas.

### **3.4 Uso de fertilizantes y plaguicidas en España.**

España experimentó un aumento progresivo en el uso de fertilizantes, llegando a alcanzar en el período entre 1997/1998 el récord histórico de consumo. Como se observa en la figura 1.11, a partir de este período se experimentó una caída progresiva debida a la PAC, a políticas medioambientales y a la mejora en la eficiencia de los fertilizantes. En la campaña de 2007/ 2009 se observa un fuerte descenso en el consumo atribuible a la caída de precios de productos agrarios, en particular de cereales y oleaginosas (García-Serrano, 2011).

Al igual que a nivel mundial, los fertilizantes nitrogenadas son los de mayor consumo en España (Figura 1.11), siendo la urea el más utilizado (MAGRAMA 2012a). Castilla y León lidera históricamente el consumo de fertilizantes ya que es la principal productora de cereales, cuyo cultivo extensivo es altamente dependiente de fertilizantes (Asociación Nacional de Fabricantes de Fertilizantes, 2012).

De acuerdo con datos del MAGRAMA (2012b) los herbicidas, fungicidas e insecticidas fueron los fitosanitarios mayormente comercializados en 2012 en España (Figura 1.12).

Antecedentes

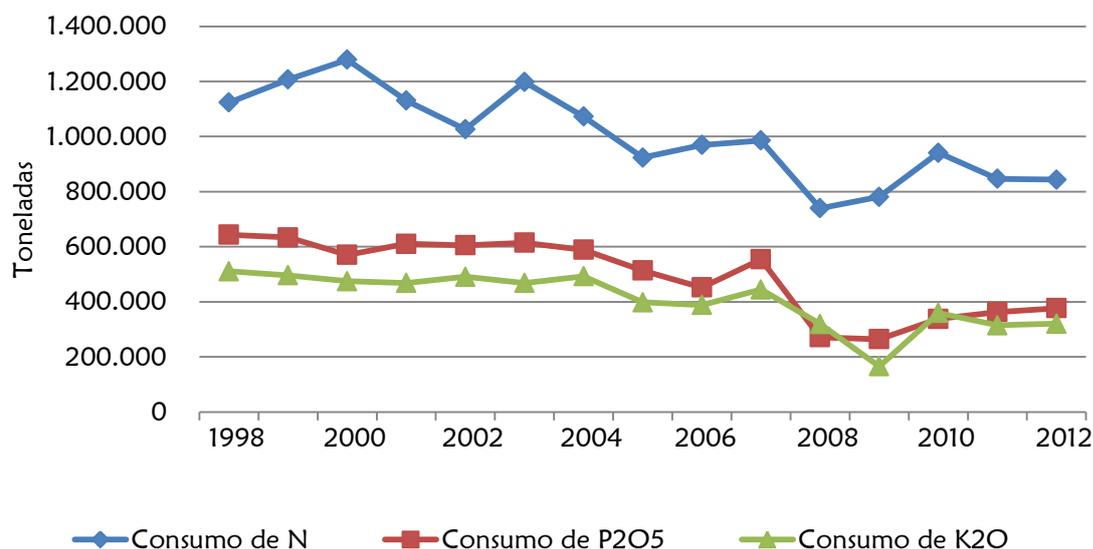


Figura 1.11. Evolución del consumo agrícola de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O en fertilizantes (toneladas) entre los años 1998 y 2012 (MAGRAMA, 2012a).

### 3.5 Regulación de fertilizantes y productos fitosanitarios.

La utilización de fertilizantes en la Unión Europea, se encuentra regulada por el Reglamento (CE) 2003/2003, de 13 de octubre del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los abonos (Consejo de las Comunidades Europeas, 2003). 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 orientadas hacia la producción de alimentos de calidad, dentro de una adecuada preservación del medio ambiente y de los recursos naturales, entre los que se encuentra la fertilidad de la tierra. La legislación actual garantiza que los productos utilizados en la nutrición vegetal o en la mejora de las características del suelo cumplen con dos requisitos fundamentales: eficacia agronómica y ausencia de efectos perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

Por otra parte, en la agricultura española además de los abonos CE, se utilizan otra serie de productos fertilizantes, entre los que cabría citar abonos orgánicos y organo-minerales, determinados abonos minerales, abonos especiales, enmiendas calizas y enmiendas orgánicas. Todos ellos no se encuentran regulados por el Reglamento CE 2003/2003, pero sí quedan contemplados en el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio sobre productos fertilizantes (España, 2013). En este real decreto se presta especial atención a los productos elaborados con materias primas de origen orgánico con el objetivo de garantizar su inocuidad para las personas y

el medio ambiente. Para estos productos se precisa su inscripción previa en el registro de productos fertilizantes, que se regula en la citada norma.

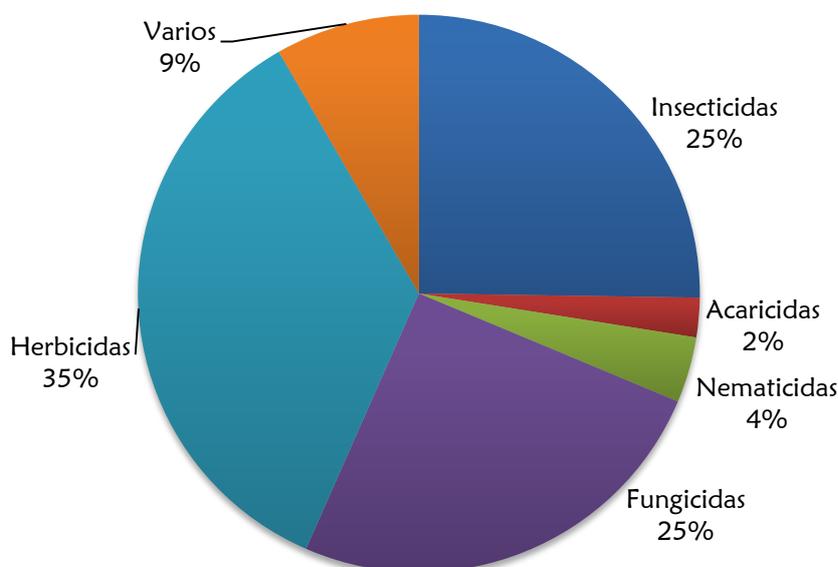


Figura 1.12. Distribución del consumo de fitosanitarios en España en base a su facturación en 2012 (MAGRAMA, 2012b).

En lo concerniente a la legislación de fitosanitarios, en la Conferencia Sectorial de Agricultura y Desarrollo Rural celebrada el 10 de diciembre de 2012, se aprobó el Plan de Acción Nacional para el uso sostenible de productos fitosanitarios, de acuerdo con lo indicado en el artículo 4 de la Directiva 2009/128/CE (Consejo de las Comunidades Europeas, 2009). En dicho plan, se establecen objetivos, medidas, calendarios e indicadores para introducir criterios de sostenibilidad en el uso de productos fitosanitarios para el periodo comprendido entre los años 2013 a 2017. Los objetivos del Plan son fomentar la gestión integrada de plagas y reducir los riesgos y efectos derivados de la utilización de productos fitosanitarios, especialmente en el ámbito de la salud humana y del medio ambiente.

El cumplimiento de estos objetivos se basa en la incentivación de la investigación, innovación y la transferencia tecnológica en la gestión integrada de plagas, en el uso sostenible de productos fitosanitarios y en el fomento de técnicas que minimicen el riesgo de la utilización de productos fitosanitarios, entre otros aspectos.

La aplicación de la “Propuesta de Directiva por la que se establece el marco de la actuación comunitarias para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas” – acordada entre el Consejo y el Parlamento Europeo – reducirá drásticamente las

materias activas utilizables para la protección de cultivos (Cepeda, 2009). En consecuencia, la sustitución total o parcial de los productos químicos de síntesis, debe basarse en la comprensión de los mecanismos de interacción y cooperación entre los microorganismos rizosféricos beneficiosos y las plantas, para una vez comprendidos, utilizarlos en agricultura en beneficio de los cultivos (Barea et al., 2005).

## 4 INOCULANTES MICROBIANOS

Una de las alternativas al uso de fertilizantes químicos y fitosanitarios es el uso de inoculantes a base de microorganismos o metabolitos derivados de éstos.

La inoculación de ciertas bacterias y hongos, ejerce efectos beneficiosos en el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante el aumento de la disponibilidad y el uso eficiente de nutrientes presentes en el suelo (Adesemoye et al., 2009). Del mismo modo, estos microorganismos también pueden utilizarse en el combate de enfermedades y plagas.

La clasificación de inoculantes depende de las reglas o leyes de cada país. Desde el punto de vista científico, pueden dividirse en biofertilizantes, fortificantes de plantas, fitoestimuladores y biopesticidas (Lugtenberg et al., 2002).

El uso de inoculantes microbianos presenta diversas ventajas frente al uso de fertilizantes químicos y fitosanitarios. Son más seguros, presentan un disminuido riesgo ambiental y un riesgo mucho menor para la salud humana; son efectivos en pequeñas cantidades; en el caso de microorganismos vivos pueden multiplicarse y sus poblaciones pueden ser controladas por la microbiota indígena del suelo; gracias a que utilizan diversos mecanismos de acción, el riesgo de aparición de resistencia es menor y pueden utilizarse en sistemas de producción convencional, en sistemas de manejo integrado de plagas o en sistemas orgánicos (Berg, 2009).

### 4.1 Producción y comercialización de inoculantes.

La inoculación de plantas con microorganismos beneficiosos era una práctica común desde hace siglos; ya desde el siglo XIX, agricultores en EE.UU recomendaban mezclar suelo en donde se había cultivado previamente una leguminosa, y aplicarlo en donde se establecía un nuevo cultivo porque mejoraba notablemente los rendimientos (Smith, 1992).

En 1896 se registró la primera patente “Nitragin” de un producto a base de *Rhizobium* sp.; con el tiempo el uso de rizobios llegó a ser una práctica frecuente y la producción de inoculantes a base de estos microorganismos estuvo en manos de pequeñas empresas. La mayor diseminación de estos biofertilizantes se dio gracias al cultivo de soja en EE.UU, Brasil y Argentina y en menor grado al cultivo de otras leguminosas en regiones como Australia, América del Norte, Europa, sureste de África y Asia; sin embargo, en países en vías de desarrollo el uso de inoculantes no ha tenido ningún impacto sobre la productividad debido a que o no se utilizaban o eran de mala calidad (Bashan, 1998).

La elaboración de inoculantes a base de microorganismos no simbióticos, también se ha investigado desde inicios del siglo XX, pero al no obtenerse resultados concluyentes, muchas de estas investigaciones se abandonaron y se retomaron posteriormente a finales del siglo XX, es el caso de *Azotobacter* en Rusia y *Bacillus* en el este de Europa. Asimismo en este periodo se realizaron evaluaciones con controladores biológicos y otros géneros de bacterias como *Azospirillum* y *Flavobacterium* (Bashan, 1998).

Hoy en día el mercado ofrece diversas opciones como biofertilizantes y controladores biológicos. En la tabla 1.3 se encuentra una lista detallada los principales inoculantes presentes en el mercado.

El consumo de inoculantes a nivel mundial se distribuye principalmente en América, con un 35% del consumo mundial, Europa con un 3%, y un 62% en el resto, atribuible en gran medida a un consumo no comercial en Asia (Philips, 2004).

El beneficio bruto de la inoculación en los países desarrollados para el fabricante está en torno a 4,65 dólares por hectárea, como resultado la facturación mundial se estimó en 75.106 dólares, considerando el mercado asiático muy poco influyente en el total ya que muchos fabricantes son empresas públicas y la calidad de los productos no es elevada (Philips, 2004).

Antecedentes

Tabla 1.3. Representantes de inoculantes microbianos (Berg, 2009).

Microorganismo	Nombre del producto	Planta, patógeno o patosistema	Compañía
<i>Ampelomyces quisqualis</i> M-10	AQ10 Biofungicide	Mildiú polvoso en manzanas, cucurbitáceas, uvas, ornamentales, fresas y tomates.	Ecogen
<i>Azospirillum</i> spp.	Biopromoter	Arroz cáscara, mijo, semillas oleaginosas, frutas, vegetales, caña de azúcar y banana	Manihardma Biotech
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	FZB24 li, TB, WG, RhizoPlus	Patatas, vegetales, ornamentales, fresas, bulbos, césped y maderables	AbiTep
<i>B. subtilis</i> cepa GB03	Kodiak	Promotor de crecimiento; <i>Rhizoctonia</i> y <i>Fusarium</i> spp.	(Gustafson); Bayer CropScience
<i>B. pumilus</i> GB34	YiedShield	Hongos patógenos de suelo	(Gustafson); Bayer CropScience
<i>B. subtilis</i> QST716	Serenade	Tabaco, tomate, lechuga, espinaca	AgraQuest
<i>B. subtilis</i> GB03, otros <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>B. megaterium</i>	Companion	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Phytophthora</i>	Growth Products
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soil implant+	Soja	Nitragin
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans WG, Intercept WG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia minor</i>	Prophyta, Biologischer, Pflanzenschutz
<i>Delftia acidovorans</i>	BioBoost	Colza	Brett-Young Seeds Limited
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Bioact WG	Nematodos	Prophyta, Biologischer, Pflanzenschutz

Tabla 1.3. Representantes de inoculantes microbianos (Berg, 2009). (Continuación).

Microorganismo	Nombre del producto	Planta, patógeno o patosistema	Compañía
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Rotex	<i>Heterobasidium annosum</i>	E-nema, Biologischer, Pflanzenschutz
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Cedomon	Rayado de la hoja, helmintoporiasis, <i>Fusarium</i> sp., mancha en la hoja; en trigo y avena	BioAgri AB
<i>P. trivialis</i> 3Re-27	Salavida	Lechuga	Sourcon Padena
<i>Pseudomonas</i> spp.	Proradix	<i>Rhizoctonia solani</i>	Sourcon Padena
<i>Serratia plymuthcia</i> HRO-C48	RhizoStar	Fresas, colza	Prophyta, Biologischer, Pflanzenschutz
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Mycostop	<i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Kemira Agro Oy
<i>Trichoderma harzianum</i> T22	RootShield PlantShield T22, Planter box	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Bioworks

## 4.2 Utilización de los inoculantes en España y en el mundo.

El control de calidad y la regulación de los inoculantes varían entre países. De esta forma, en los EE.UU. o en el Reino Unido este control lo ejerce el fabricante, en otros países se lleva a cabo mediante una organización a la que se adhieren voluntariamente los fabricantes, como Sudáfrica o Australia, o está regulado mediante una institución gubernamental, como en Uruguay o Brasil. Sin embargo, la legislación desfavorable para las patentes de Latinoamérica, por ejemplo la de Brasil o la de México, tiene como consecuencia una inversión privada reducida en investigación y desarrollo de nuevos productos, con lo que la financiación de la investigación está en el sector público (Hungria et al., 2005).

También existen diferencias nacionales en la política de recomendación de cepas para la inoculación. En los EE.UU. cada compañía determina las cepas que

empleará en sus productos, mientras que en Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) los inoculantes deben contener las cepas recomendadas por organismos públicos competentes en esa materia. El mercado global de los inoculantes se puede dividir en dos sectores (Phillips, 2004). En primer lugar está el sector comercial desarrollado de América, Europa y Australia, dominado por pocos fabricantes, con gran calidad de los inoculantes, que responden a los controles de calidad legislativos o no legislativos de estos países, con gran competencia que presiona a los fabricantes hacia la mejora de la calidad y competitividad (Lupwayi et al., 2000; Catroux et al., 2001; Bullard et al., 2005). En contraste, el sector de los inoculantes para leguminosas en Asia y África es menos sofisticado y más fragmentado, con elevada variabilidad en calidad en los inoculantes y más fabricantes (Lupwayi et al., 2000).

Los retos de los mercados desarrollados de inoculantes son el desarrollo de nuevas tecnologías y productos a nivel de la industria y refinar las prácticas de inoculación a nivel del agricultor, mientras que para el mercado afroasiático los retos están basados en la calidad y en la distribución, extendiendo más su empleo. Por ejemplo, Vietnam produce anualmente alrededor de 700.000 ha de leguminosas sin inoculación y a las que se les añaden 50-150 kg N ha<sup>-1</sup> en forma de fertilizantes (Herridge, 2005).

En España existen varias empresas que se dedican al desarrollo de inoculantes, entre ellas ResBioAgro y IAB (Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas).

La legislación española no establece listas de microorganismos admitidos para su empleo como inoculantes, ni define el control de calidad de los inoculantes comercializados en España. El MAGRAMA, mantiene el Registro de Productos Fitosanitarios (MAGRAMA, 2010a) y existe una serie de sustancias activas reconocidas y registradas como fitosanitarios (Sustancias activas de productos fitosanitarios) aceptadas, excluidas y en revisión comunitaria a 24 de junio de 2014. En estas listas aparecen microorganismos reconocidos como bioinsecticidas o fungicidas, como *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* o *Streptomyces*. También el MAGRAMA presenta el registro de OCB (organismos de control biológico, que sólo contempla macroorganismos) y OMDF (otros medios de defensa fitosanitaria), que contempla bacterias como *Azotobacter* y hongos micorrícicos (MAGRAMA, 2010b, 2010c).

Por lo tanto, en la actualidad no existe un registro oficial donde aparezcan los inoculantes comercializados en España.

## 5 ESCENARIO ACTUAL.

La concesión de las figuras de calidad (IGP) al Pimiento de Fresno-Benavente y a la Alubia de La Bañeza-León, es una oportunidad importante para aumentar la rentabilidad de los mismos, tanto en fresco como transformados, lo segundo especialmente en el caso del pimiento. Este hipotético aumento de rentabilidad del producto estará ligado a un aumento de su valor añadido. Precisamente el aumento del valor añadido de los productos agroalimentarios figura con el número 2 entre las medidas y actuaciones horizontales dentro del Marco Nacional de Desarrollo Rural 2007-2013 (MAGRAMA, 2007).

Sin embargo, el aumento real del valor añadido dependerá de que los consumidores lo perciban y estén dispuestos a elegir el producto frente a otros sustitutivos (Santesmases, 2000), de precio más bajo. Para que los consumidores perciban un alto valor añadido, no solo debe ser organolépticamente excepcional, saludable y nutritivo, sino que cada vez son más los que buscan productos naturales producidos mediante técnicas respetuosas con el medio ambiente (Krystallis y Chryssohoidis, 2005). En ese sentido la utilización de agroquímicos cada día está peor visto por el consumidor que busca productos naturales y que está concienciado con el medio ambiente. Pero ya no se trata solamente de una cuestión de percepción de calidad por parte de los consumidores, sino que por imperativo legal, la utilización de fertilizantes químicos de síntesis y fitosanitarios está cada vez más limitada y es necesario encontrar productos alternativos a los mencionados.

No obstante para que realmente haya un aumento de rentabilidad, los costes de producción deben mantenerse lo más ajustados posible, ya que estudios realizados por este equipo de investigación, demuestran que solo el 40% los consumidores están dispuestos a pagar hasta un 10% más por el producto. Los consumidores que estarían dispuestos a pagar más de un 10% más son prácticamente inexistentes (Urbano et al., 2007, 2008).

## 6 REFERENCIAS

- Adesemoye, A., Torbert, H., & Kloepper, J. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58(4), 921-929.
- Asociación Empresarial para la Protección de las plantas (AEPLA). (2012). Evolución del mercado fitosanitario. En: <<http://www.aepla.es/el-mercado-fitosanitario/evolucion-del-mercado>>. Revisado el 2 de junio de 2014.
- Asociación Nacional de Fabricantes de Fertilizantes (ANNFE). (2012). Evolución del consumo de fertilizantes químicos inorgánicos en España. En: <<http://www.anffe.com/informaci%F3n%20sectorial/evoluci%F3n%20del%20consumo/index.html>>. Revisado el 3 de junio de 2014.
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.
- Allen, O. N., & Allen, E. K. (1981). *The leguminosae, a source book of characteristics, uses, and nodulation*. University of Wisconsin Press. Madison, Wisconsin.
- Barea, J., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Barlóg, P., & Grzebis, W. (2004). Effect of timing and nitrogen fertilizer application on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). I. Growth dynamics and seed yield. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190(5), 305-313.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.
- Bennink, M. (2002). Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutrition and Cancer*, 44(1), 60-65.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Bielecki, R. (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 225-252.
- Broughton, W., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55-128.

- Bullard, G. K., Roughley, R. J., & Pulsford, D. J. (2005). The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953–2003. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45, 127-140.
- Casquero, P. A., Lema, M., Santalla, M., & De Ron, A. M. (2006). Performance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 1021–1032.
- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230, 21-30.
- Cepeda, S. (2009). Nueva normativa Europea sobre comercialización y uso de fitosanitarios: Posibles repercusiones para la agricultura. *Tierras de Castilla y León*, 159, 6-19.
- Chacón, M. I., Pickersgill, B., & Debouck, G. D. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3), 432-444.
- Consejo de las Comunidades Europeas (2003). Reglamento (CE) nº 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a los abonos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 304 de 21/11/2003.
- Consejo de las Comunidades Europeas (2006). Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 369 de 23/12/2006.
- Consejo de las Comunidades Europeas (2009). Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* nº L 309 de 24/11/2009.
- Consejo Regulador IGP Alubia de la Bañeza-León. (2005). En: <<http://www.alubiadelabanezaleon.com/>>. Revisado el 5 de mayo de 2014.
- Conway, G. R., & Barbier, E. B. (2013). *After the green revolution: Sustainable agriculture for development*. Earthscan Pub, London.
- D'Arcy, W. G., Keating, R. C., Zhang, Z., & Peng, C. (2001). The genus *Tubocapsicum* (Solanaceae). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 68-84.
- De Ron, A. M., Casquero, P. A., González, A. M., & Santalla, M. (2004). Environmental and genotypic effects on pod characteristics related to common bean quality. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190, 1-8.

## Antecedentes

- De Felipe, M. (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En: Bedmar, E. J., González, J., Luch, C., & Rodelas, B. (eds). Fijación De Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada, España.
- De, A. K. (2004). *Capsicum: The genus Capsicum*. Taylor and Francis. London.
- Debouck, D., & Hidalgo, R. (1986). Morphology of the common bean plant *Phaseolus vulgaris*. CIAT. Cali, Colombia.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107-149.
- España. (2006). Orden APA/289/2006, de 27 de enero, por la que se ratifica el Reglamento de la indicación geográfica protegida «Alubia de La Bañeza-León». Boletín Oficial del Estado núm. 35 de viernes 16 de febrero de 2006. p.5347-5354.
- España. (2009). Resolución de 23 de julio de 2009, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la indicación geográfica protegida «Pimiento de Fresno-Benavente». Boletín Oficial del Estado núm. 201 de jueves 20 de agosto de 2009. p.71663-71668.
- España. (2010). Resolución de 10 de febrero de 2010, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la modificación de la indicación geográfica protegida «Pimiento Asado del Bierzo». Boletín Oficial del Estado núm. 64 de lunes 15 de marzo de 2010. p.25931-25937.
- España. (2013). Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado núm. 164 de miércoles 10 de julio de 2013. p.51119-51207.
- FAO. (2009) Anuario FAO. En: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)>. Revisado el 15 de mayo de 2014.
- FAOStat. (2012). En: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Revisado el 2 de mayo de 2014.
- Galloway, J. N., Schlesinger, W. H., Levy, H., Michaels, A., & Schnoor, J. L. (1995). Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochemical Cycles*, 9(2), 235-252.
- García-Serrano, P. (2011). Evolución del mercado de fertilizantes. *Tierras*, 184 extra, 22-24.

- Gepts, P., & Bliss, F. (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and África. *Economic Botany*, 42(1), 86-104.
- Gepts, P., & Debouck, D. (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: van Schoonhoven, A., Voysest, O. (eds). *Common Beans: Research for Crop Improvement*. CAB, Wallingford, Reino Unido - Cali, Colombia, p 7–53.
- Graham, P. (1978). Some problems and potentials of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Latin América. *Field Crops Research*, 1, 295-317.
- Graham, P., & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1), 131-146.
- Herridge, D. F. (2005). Inoculation technology for legumes. En: Dilworth, M J., James, E. K; Sprent, J. I., Newton, W. E (eds). *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Hungria, M., Loureiro, M. F., Mendes, I. C., Campo, R. J., & Graham, P. H. (2005). Inoculant preparation, production and application. En: Werner, D., & Newton, W. E. (eds). *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology*. Springer, Dordrecht, Holanda
- International Fertilizer Industry Association. (2013). *Fertilizer indicators*. IFA. París, Francia.
- Krystallis, A., & Chrysohoidis, G. (2005). Consumer willingness to pay for organic food. Factors that affect it and variation per organic product type. *British Food Journal*, 107, 320-343.
- Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F., & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe–plant interactions: Principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 373-383.
- Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., & Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65, 259-270.
- MAGRAMA. (s.f). Material vegetal: pimiento. En: <<http://www.magrama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2523>>. Revisado el 22 de abril de 2014.
- MAGRAMA. (2007). *Marco Nacional de Desarrollo Rural*. Madrid, 22 de octubre de 2007.

## Antecedentes

MAGRAMA. (2010a). Registro de Productos Fertilizantes. En: <<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp#art1>> Revisado el 3 de junio de 2014.

MAGRAMA. (2010b). Registro de Organismos de Control Biológico. En: <<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroOCB.pdf>>. Revisado el 5 de junio de 2014.

MAGRAMA. (2010c.) Registro de Otros Medios de Defensa Fitosanitaria. En: <<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroODMF.pdf>>. Revisado el 5 de junio de 2014.

MAGRAMA. (2012a). Anuario de estadística 2012. En: <<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2012/default.aspx?parte=3&capitulo=15&grupo=2>>. Revisado el 25 de abril de 2014.

MAGRAMA. (2012b). Anuario de estadística 2012. En: <<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2012/default.aspx?parte=3&capitulo=15&grupo=3>>. Revisado el 25 de abril de 2014.

MAGRAMA. (2013a). Anuario de estadística 2013. En: <<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2013/default.aspx?parte=3&capitulo=13&grupo=2&seccion=2>>. Revisado el 20 de abril de 2014.

MAGRAMA. (2013b). Anuario de estadística 2013. En: <<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2013/default.aspx?parte=3&capitulo=13&grupo=6&seccion=28>>. Revisado el 20 de abril de 2014.

Marín Rodríguez, J. (2007). Portagrano. Vademécum de variedades hortícolas. Almería.

Maroni, M., Fanetti, A. C., & Metruccio, F. (2006). Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *La Medicina Del Lavoro*, 97(2), 430-437.

Matheny, R. T., & Gurr, D. L. (1983). Variation in prehistoric agricultural systems of the New World. *Annual Review of Anthropology*, 12, 79-103.

McLeod, M., Guttman, S. I., & Eshbaugh, W. H. (1982). Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36(4), 361-368.

Naciones Unidas. (2010). *The Millennium Development Goals Report 2010*. New York.

- Odegard, I., & van der Voet, E. (2014). The future of food—Scenarios and the effect on natural resource use in agriculture in 2050. *Ecological Economics*, 97, 51-59.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57(4), 1159-1181.
- Palevitch, D., & Craker, L. (1996). Nutritional and medical importance of red pepper (*Capsicum* spp.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 3(2), 55-83.
- Pernezny, K., Roberts, P. D., Murphy, J. F., & Goldberg, N. P. (2003). Compendium of pepper diseases. American Phytopathological Society (APS Press). St. Paul, MN.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., . . . Zeidler, J. A. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315(5814), 986-988.
- Phillips P. W B. (2004). An economic assessment of the global inoculant industry. En: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/inoculant/>>. Revisado el 4 de junio de 2014.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96(1), 129-133.
- Reinoso, B., Boto, J., & González, L. (2007). Variedades locales de alubia o judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) de la provincia de León. Universidad de León. León, España.
- Rodiño, P. A., Santalla, M., De Ron, A. M., & Drevon, J. (2010). Co-evolution and migration of bean and rhizobia in Europe. *Sociology, organic farming, climate change and soil science*, 3, 171-188.
- Rubio Pérez, L. M. 1987. La Bañeza y su tierra, 1650-1850. Un modelo de sociedad rural leonesa. Universidad de León. León, España.
- Runge-Metzger, A. (1995). Closing the cycle: Obstacles to efficient P management for improved global food security. *Scope-Scientific Committee on Problems of the Environment International Council of Scientific Unions*, 54, 27-42.
- Santalla, M., Rodiño, A., & De Ron, A. (2002). Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7), 934-944.
- Santesmases, M. (2000). *Marketing. Conceptos y estrategias*. Pirámide, Madrid, España.
- Smil, V. (1999). Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles*, 13(2), 647-662.

## Antecedentes

- Smith, R. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485-492.
- Tilman, D. (1998). The greening of the green revolution. *Nature*, 396(6708), 211-212.
- Vallespir, A. N., Milla, A., Díaz, Juan de Dios Gamayo, Vera, A. L. A., & Morató, M. G. (2010). El pimiento en el mundo. *Compendios de Horticultura*.
- Van Schoonhoven, A., & Voysest, O. (eds). (1991). *Common beans: Research for crop improvement*. CAB International y CIAT. Wallingford, Reino Unido y Cali, Colombia.
- Vance, C. P. (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. En: Spaink, H. P., Kondorosi, A., & Hooykaas, P. J. J (eds). *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Vance, C. P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiology*, 127(2), 390-397.
- Viñals, F. N., Ortega, R. G., & García, J. C. (1996). *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España.
- Zhigila, D. A., AbdulRahaman, A. A., Kolawole, O. S., & Oladele, F. A. (2014). Fruit morphology as taxonomic features in five varieties of *Capsicum annum* L. Solanaceae. *Journal of Botany*, 2014, 1-6.
- Urbano, M., González-Andrés, F., & Casquero, P. (2007). El conocimiento y consumo del tomate de Mansilla de las Mulas (León) como estrategia de desarrollo rural. Libro de actas del VI Congreso de Economía Agraria. Asociación Española de Economía Agraria.
- Urbano, M., González-Andrés, F., & Casquero, P. (2008). Market research for the optimization of the consumer response to the recent award of a Protected Geographical Indication to a local product: Beans from “La Bañeza-León”, Spain. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing*, 20(2), 7-32.

**ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA**



## 1 INTRODUCCIÓN

La comunidad microbiana presente en el suelo actúa en diversos procesos, no sólo modulando su estructura, sino también interviniendo en bioprocesos claves para la vida como los ciclos del carbono y del nitrógeno (Barea et al., 2004), la recirculación de nutrientes (Rodríguez y Fraga, 1999) y la nutrición de las plantas (Dobbelaere et al., 2003).

Existen decenas de miles de especies de microorganismos asociados a las raíces de las plantas (Berendsen et al., 2012), entre ellos algas, hongos y bacterias. Las bacterias forman el grupo más numeroso, alrededor del 95% de la población rizosférica (Schoenborn et al., 2004). La mayor parte de las interacciones que se dan entre los microorganismos ocurren en la rizosfera, que es la zona del suelo que se encuentra alrededor de las raíces de las plantas y que está altamente influenciada por la actividad radicular (Ryan et al., 2009). Debido a esta actividad se depositan en ella exudados radicales que pueden ser utilizados como fuente de energía para el crecimiento de poblaciones microbianas. Al mismo tiempo, la presencia de estos microorganismos aporta nutrientes para las plantas promoviendo interacciones beneficiosas, neutrales o perjudiciales entre las plantas y los microorganismos (Lynch, 1990).

Durante años se ha investigado sobre las relaciones beneficiosas que existen entre bacterias y plantas. Una de estas relaciones es la promoción del crecimiento que ejercen ciertas bacterias sobre las plantas. Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas se denominan PGPB, por su nombre en inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”; si estas bacterias se encuentran en la rizosfera, se denominan PGPR, “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (Kloepper et al., 1989). Según Glick (2012), los mecanismos mediante los cuales actúan las PGPR se dividen en directos e indirectos; los indirectos están relacionados con el biocontrol ejercido por las bacterias sobre los microorganismos fitopatógenos. Entre los mecanismos directos se encuentran la facilitación de la adquisición de recursos, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de sideróforos, de ácido indolacético, de citoquininas y giberelinas y la degradación del etileno.

Las PGPR pueden utilizar uno o varios de estos mecanismos para beneficiar a la planta hospedadora. El fósforo se encuentra en altas cantidades en el suelo, aunque en su mayoría en forma insoluble (Ke et al., 2004), por tanto no disponible para las plantas. La solubilización de este elemento se realiza mediante la acción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y el ácido cítrico, sintetizados por rizobacterias del suelo (Rodríguez y Fraga, 1999). Al igual que el fósforo, la forma iónica más común del hierro,  $Fe^{+3}$ , tampoco puede ser asimilada por las plantas, por tanto la cantidad de hierro disponible para el crecimiento de las plantas es limitado; sin embargo, las bacterias sintetizan

moléculas de bajo peso molecular llamadas sideróforos, que se unen al  $Fe^{3+}$ . Este complejo es asimilado por las bacterias y las plantas (Kloepper et al., 1980; Neilands, 1995). El ácido indolacético (IAA) es una auxina que interviene en la división, extensión y diferenciación celular, entre otros procesos, y es sintetizada tanto por la planta como por las bacterias. El IAA sintetizado por las bacterias afecta particularmente la promoción del crecimiento y la nodulación de las raíces. El papel que juega el IAA en la modulación de los procesos de crecimiento es complejo y depende de los niveles de la auxina para fomentar el crecimiento o la nodulación (Spaepen et al., 2007). Otro de los mecanismos indirectos mediante el cual actúan las PGPR es la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Glick et al., 2007). Esta enzima, conocida como la hormona del estrés, disminuye los niveles de etileno, cuya acción desencadena procesos de senescencia, clorosis y abscisión; en resumen acelera la muerte de la planta (Bleecker y Kende, 2000). El ACC es un precursor del etileno y la enzima ACC desaminasa cataliza la descomposición del ACC en amonio y  $\alpha$ -ketobutirato, deteniendo los procesos de senescencia en la planta (Penrose y Glick, 2003).

La fijación de nitrógeno, proceso mediante el cual se convierte el  $N_2$  en amonio para que pueda ser asimilado por la planta, se lleva a cabo gracias a la acción de bacterias fijadoras de nitrógeno llamadas diazotrofos. La mayor parte del nitrógeno fijado se atribuye a bacterias que pertenecen mayoritariamente a los géneros, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* y *Burkholderia* y llevan a cabo este proceso en simbiosis con leguminosas. Existen otros diazotrofos, llamados de vida libre como *Azospirillum* y *Azotobacter*, que fijan pequeñas cantidades de nitrógeno y pueden promover el crecimiento de las plantas no leguminosas comportándose como PGPR (Dobbelaere et al., 2003; Glick, 2012).

La acción de las PGPR está ampliamente documentada; entre los géneros de bacterias más comunes utilizadas como PGPR se encuentran *Rhizobium*, no solo como fijador de nitrógeno en leguminosas, sino también como promotor de crecimiento en no leguminosas (Noel et al., 1996; Antoun et al., 1998; García-Fraile et al., 2012) y especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Barea y Brown, 1974; Idriss et al., 2002; Choi et al., 2008; Felici et al., 2008; Rosas et al., 2009; Moutia et al., 2010).

## 1.1 Biodiversidad de bacterias rizosféricas

La biodiversidad de microorganismos presentes en la rizosfera está determinada tanto por el genotipo de la planta como por el tipo de suelo y el ambiente (Berendsen et al., 2012), consecuentemente existen variaciones entre las

comunidades de PGPR asociadas a un cultivo o a una región (Miethling et al., 2000). Esta biodiversidad puede ser analizada mediante técnicas metagenómicas (sin aislamiento) que permiten conocer la identidad tanto de los microorganismos cultivables como de los no cultivables, sin embargo cuando el objetivo final de los estudios de biodiversidad es el diseño de biofertilizantes, el aislamiento de las bacterias rizosféricas ligadas a una planta o cultivo específicos es absolutamente necesario. Este aislamiento permite la evaluación mediante el cultivo en medios selectivos de sus posibles propiedades como PGPR (Barriuso et al., 2008; García-Fraile et al., 2012).

El análisis de la biodiversidad bacteriana se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas, pero actualmente lo más común es utilizar herramientas moleculares. En las últimas décadas se han desarrollado métodos destinados a la evaluación de la diversidad microbiana basados en análisis de proteínas, poliaminas, quinonas y lípidos polares, pero fundamentalmente en el análisis de ácidos nucleicos. Las técnicas basadas en ácidos nucleicos más utilizadas actualmente, en estudios de biodiversidad microbiana se basan en el ADN y precisan de la amplificación del mismo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una vez amplificado el ADN se pueden obtener perfiles de RFLP cortando con diferentes enzimas de restricción (Ambrosini et al., 2012; Beneduzi et al., 2013), que son denominados ARDRA cuando se aplica a genes ribosómicos (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Compant et al., 2011; Loaces et al., 2011; Fürnkranz et al., 2012; Montañez et al., 2012; de Lyra et al., 2013), o mediante PCR directa. En este último caso se pueden obtener perfiles que diferencian a nivel de cepa como ocurre en el caso de los RAPD, ERIC, REP, etc. (Nocker et al., 2007) o a niveles taxonómicos superiores, como ocurre en el caso de los perfiles denominados TP-RAPD que permiten discriminar hasta nivel de subespecie (Rivas et al., 2001; Rivas et al., 2002). Estos perfiles se obtienen en condiciones especiales utilizando los mismos primers que sirven para amplificar el gen ribosómico 16S y se han utilizado en estudios de diversidad de bacterias endófitas de caña de azúcar y bacterias solubilizadoras de fosfato (Velázquez et al., 2008; Azziz et al., 2012).

La ventaja de los perfiles de TP-RAPD es que permiten seleccionar taxones con diferentes secuencias del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S (*gen rrs*), que está secuenciado en todas las especies bacterianas, es el más utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas en bacterias y sigue siendo la base actual de la clasificación de estos microorganismos (Woese et al., 1984; Olsen et al., 1986; Woese, 1987; Woese, 2001). Contiene aproximadamente 1500 nucleótidos y, además de tener regiones conservadas que permiten el estudio de las relaciones entre taxones distantes, contiene regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies, por lo que se utiliza para la identificación de

microorganismos (Olsen et al., 1986; Ludwig y Schleifer, 1994; Roselló-Mora y Amann, 2000; Stackebrandt et al., 2002; Tindall et al., 2010; Oren y Garrity, 2014).

## 2 OBJETIVOS

El pimiento (*Capsicum annuum*) y la alubia (*Phaseolus vulgaris*) son dos cultivos de importancia agronómica en la provincia de León. La alubia variedad Riñón menudo y el pimiento morrón ecotipo “de Fresno” pertenecientes a la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Alubia de la Bañeza-León” y “Pimiento de Fresno-Benavente”, respectivamente, son productos que demandan un alto estándar de calidad. Por consiguiente requieren una alternativa al uso de agroquímicos lo que los convierte en candidatos para la selección de putativas PGPR. El objetivo de este trabajo consistió en la determinación de la biodiversidad de rizobacterias asociadas a estos cultivos y en la evaluación *in vitro* de capacidades promotoras del crecimiento vegetal.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Muestreo y aislamiento de bacterias endofíticas

Se muestrearon fincas de alubia variedad Riñón menudo y pimiento morrón ecotipo “de Fresno” pertenecientes a la IGP “Alubia de la Bañeza-León” y “Pimiento de Fresno-Benavente”, ubicadas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, España, durante los meses de junio y julio del año 2010 (Tablas 2.1 y 2.2). La selección de las parcelas de muestreo la realizó el personal de las IGP. Se realizaron análisis completos de suelos de cada una de las zonas muestreadas (Anexo, Tablas A.1 y A.2). Se recolectaron raíces sanas *in situ* de plantas de alubia y pimiento para el aislamiento de bacterias endofíticas. Para su aislamiento, las raíces frescas se esterilizaron superficialmente con una solución de etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 6% durante 6 minutos y 6 lavados consecutivos con agua estéril. Posteriormente, se procedió a triturar las raíces con agua estéril. El líquido desprendido se sembró en placas con medio de cultivo tryptic soy agar (TSA, Difco) y cicloheximida como agente antifúngico a una concentración de 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Se hizo una solución madre de cicloheximida (500x) en etanol al 70%, se esterilizó mediante filtro millipore y se almacenó a -20 °C. La cicloheximida se agregó al medio cuando éste alcanzó una temperatura aproximada de 50 °C, antes de distribuirlo en las placas Petri. Las placas se incubaron a 28 °C entre 48 y 96 horas y se llevaron a cabo sucesivas resiembras hasta obtener colonias aisladas. Las colonias puras seleccionadas se

guardaron en glicerol al 30% (agente crioprotector) para su conservación a -80 °C.

Tabla 2.1. Localización y georreferenciación de los suelos muestreados en el cultivo de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en la demarcación de la IGP “Alubia de La Bañeza-León”, indicando el número de plantas muestreadas.

Código	Provincia	Comarca	Municipio	Localidad	Paraje o denominación de la finca	Coordenadas de la parcela	Altitud (m)	Número de plantas muestreadas
SLB	León	Cepeda	Villamejil	Sueros de Cepeda	La Barralla			3
SRN	León	Cepeda	Villamejil	Sueros de Cepeda	Río Navares	N 42° 37.434'; W 6° 01.974'	942	3
SCB	León	Cepeda	Villamejil	Sueros de Cepeda	Carabal			3
BLQ	León	El Páramo	Bercianos del Páramo	Bercianos del Páramo	Los Quintanales			3
BMA	León	El Páramo	Bercianos del Páramo	Bercianos del Páramo	Manzorral	N 42° 23.126'; W 5° 43.790'	828	3
BCS	León	El Páramo	Bercianos del Páramo	Bercianos del Páramo	Carretera de Santa María			3
VCC	León	Esla-Campos	Villaornate y Castro	Villaornate	Calle Campazas	N 42° 10.800'; W 5° 32.217'	741	3
VCV	León	Esla-Campos	Villaornate y Castro	Villaornate	Arenosa			3
PPSA	León	El Páramo	Pobladura de Pelayo García	Pobladura de Pelayo García	Sección A			3
PPSB	León	El Páramo	Pobladura de Pelayo García	Pobladura de Pelayo García	Sección B	N 42° 19.275'; W 5° 39.596'	787	3
PPSC	León	El Páramo	Pobladura de Pelayo García	Pobladura de Pelayo García	Sección C			3
RVPA	León	La Bañeza	Riego de la Vega	Riego de la Vega	Finca Pedreiro A			3
RVPB	León	La Bañeza	Riego de la Vega	Riego de la Vega	Finca Pedreiro B	N 42° 23.450'; W 5° 58.650'	803	3
RVSV	León	La Bañeza	Riego de la Vega	Riego de la Vega	La Senda del Villar			3

Tabla 2.2. Localización y georreferenciación de los suelos muestreados en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en la demarcación de la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente”, indicando el número de plantas muestreadas.

Código	Provincia	Comarca	Municipio	Localidad	Paraje o denominación de la finca	Coordenadas de la parcela	Altitud (m)	Número de plantas muestreadas
FCA	León	Esla-Campos	Fresno de la Vega	Fresno de la Vega	Zona Campo			3
FCB	León	Esla-Campos	Fresno de la Vega	Fresno de la Vega	Campo/Oteros	N 42° 20.696' W 5° 31.656'	755	3
FVA	León	Esla-Campos	Fresno de la Vega	Fresno de la Vega	Zona de la Vega			3
SCFA	Zamora	Benavente y los Valles	San Cristóbal de Entreviñas	San Cristóbal de Entreviñas	Zona Farradal A			3
SCFB	Zamora	Benavente y los Valles	San Cristóbal de Entreviñas	San Cristóbal de Entreviñas	Zona Farradal B	N 42° 02.305' W 5° 39.164'	724	3
SCFC	Zamora	Benavente y los Valles	San Cristóbal de Entreviñas	San Cristóbal de Entreviñas	Zona Farradal C			3
SCE	Zamora	Benavente y los Valles	San Cristóbal de Entreviñas	San Cristóbal de Entreviñas	El Palero	N 42° 02.305' W 5° 39.164'	724	3
MTA	Zamora	Benavente y los Valles	Micereces de Tera	Micereces	Arrotos de Tierra			3
MM M	Zamora	Benavente y los Valles	Micereces de Tera	Micereces	María Marcela	N 41° 59.362' W 5° 52.637'	732	3
MJC	Zamora	Benavente y los Valles	Micereces de Tera	Micereces	Jose Carlos			3

### 3.2 Evaluación *in vitro* de propiedades promotoras del crecimiento vegetal de los aislamientos provenientes de raíces

Los aislados bacterianos puros provenientes de raíces de alubia y pimiento, utilizados en las pruebas *in vitro* se incubaron durante un tiempo mínimo de 3 días en medio TSA.

### 3.2.1 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico

Se utilizó la metodología basada en (Sylvester-Bradley et al., 1982). Los aislamientos bacterianos puros se sembraron en medio TSA y una vez obtenida suficiente masa bacteriana se pasaron a placas Petri con medio YED-P (extracto de levadura 2 g l<sup>-1</sup>, glucosa 10 g l<sup>-1</sup>, agar 12 g l<sup>-1</sup>, fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 4 g l<sup>-1</sup>). Cada Placa de YED-P se dividió en 5 secciones y en cada una se inoculó, con ayuda de un palillo de madera esterilizado, un aislamiento proveniente del medio TSA. Los aislamientos se incubaron a 28 °C durante una semana. Se evaluó la formación de un halo transparente en el medio de cultivo alrededor de cada colonia que indicó la solubilización de fosfato presente en el medio.

### 3.2.2 Determinación de la capacidad de producir sideróforos

La producción de sideróforos de los aislamientos se evaluó cualitativamente mediante el procedimiento descrito por Alexander y Zuberer (1991). Se preparó el medio de cultivo CAS agar a partir de 4 soluciones esterilizadas por separado y mezcladas posteriormente (Tabla 2.3). Una vez esterilizadas en autoclave, las soluciones se enfriaron hasta alcanzar una temperatura de 50 °C y se mezclaron las 4 soluciones en agitación constante con el objetivo de evitar la formación de burbujas. La solución 3 se agregó a la solución 2, luego se agregó la solución 1 y finalmente se agregó la solución 4, cuando la mezcla alcanzó una temperatura de 50 °C. Todo el material de vidrio se lavó con 3M HCl.

Después de mezclar las soluciones, el medio se vertió en placas Petri. Los aislados bacterianos puros provenientes de TSA se pasaron con un palillo de madera esterilizado a la placa con medio CAS agar (dividida en 5 partes: 5 bacterias por placa) y se incubaron a 28 °C durante una semana. Se evaluó la formación y el tamaño de un halo naranja en el medio de cultivo alrededor de cada colonia. El tamaño del halo se clasificó en 3: diámetro mayor de 10 mm, diámetro entre 5 y 10 mm y diámetro menor de 5 mm.

Tabla 2.3. Composición de las soluciones para la preparación del medio CAS agar.

Solución	Composición	Observaciones
Solución 1 (Indicadora)	10 ml 1mM FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O [En 10mM HCl] con 50 ml de una solución acuosa de CAS* (1,21 mg ml <sup>-1</sup> ) (púrpura oscuro). Añadir lentamente y en constante movimiento a 40 ml de una solución acuosa de HDTMA** (1,82 mg ml <sup>-1</sup> )	Color de la solución resultante: azul oscuro. Todos los reactivos se deben preparar frescos cada vez que se prepara la solución. Se puede esterilizar en autoclave
Solución 2 (Buffer)	Disolver 30,24 g de PIPES*** en 750 ml de solución salina compuesta por 0,3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g NaCl y 1 g NH <sub>4</sub> Cl. Ajustar pH a 6,8 con 50% KOH. Agregar 15 g de agar y llevar a un volumen de 800 ml con agua destilada	Se puede esterilizar en autoclave
Solución 3	Agregar a 70 ml de agua destilada: 2 g glucosa, 2 g manitol, 493 mg MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 11 mg CaCl <sub>2</sub> , 1,17 mg MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 1,4 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0,04 mg CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 1,2 mg ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O y 1 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Se puede esterilizar en autoclave
Solución 4 (CAS aminoácidos)	30 ml de cas amino ácidos**** 10%	No se puede esterilizar en autoclave. Esterilizar mediante filtro millipore antes de mezclar con el resto de soluciones esterilizadas. Almacenar a 4 °C.

\*Cromo azurol 5

\*\*Hexadeciltrimetilamonio bromuro. Detergente catiónico que se añade para estabilizar la solución indicadora responsable del color azul característico del medio

\*\*\*1,4-piperazina dietano ácido sulfónico

\*\*\*\*Caseína hidrolizada ácida

### 3.2.3 Determinación de la capacidad de síntesis de auxinas

La producción de auxinas en presencia de L-triptófano se determinó colorimétricamente (Khalid et al., 2004). Los aislamientos bacterianos purificados procedentes de TSA se resuspendieron en 4 ml de solución salina al 0,9% (1x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) y se incubaron 500 µl de esta suspensión en 4 ml de medio tryptic soy broth (TSB, DIFCO) durante 3 días en oscuridad a 28 °C y se agitaron 2 veces por día para favorecer su crecimiento. Al cabo de 3 días, se transfirieron 500 µl a viales con 4 ml de medio mínimo JMM (O'Hara et al., 1989) modificado (Tabla 2.4). Además se tomó 1 ml y se midió la densidad óptica (OD) a 600 nm para la determinación del crecimiento bacteriano. Los viales se incubaron durante 4 días

en oscuridad a 28°C y se agitaron 2 veces por día. Al terminar esta fase de incubación, se tomaron 1,5 ml del medio y se centrifugó 10 minutos a 5000 g, se recuperó 1 ml del sobrenadante y se agregó a 1 ml del agente Salkowski (0,01 M FeCl<sub>3</sub> y ácido perclórico al 34,3%). La mezcla se dejó reposar 30 minutos y se midió la OD a 535 nm. Se prepararon 100 ml del agente Salkowski agregando 2 ml de 0,5 M FeCl<sub>3</sub>, 98 ml de ácido perclórico al 35% y 2 ml de agua.

La determinación de la producción de auxinas se hizo mediante la cuantificación de  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de IAA equivalentes, por comparación con una curva patrón elaborada con IAA (Sigma). El rango de concentración de IAA para la elaboración de la curva patrón fue de 0 a 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Cada aislamiento bacteriano se evaluó por duplicado. Se calculó la media y los valores que dividen la muestra en terciles con el software SPSS.

Tabla 2.4. Composición y elaboración del medio JMM modificado.

Reactivos	Cantidades l <sup>-1</sup>	<sup>2</sup> Solución stock de vitaminas	Cantidades
D-(+)-galactosa	1,8 g	Riboflavina	20 mg
L-(+)-arabinosa	1,5 g	Ácido P-amino benzoico	20 mg
Sales <sup>1</sup> *	10 ml	Ácido nicotínico	20 mg
Agua destilada	969 ml	Biotina	20 mg
Vitaminas <sup>2</sup>	1 ml**	Tiamina-HCl	20 mg
L-triptófano <sup>3</sup>	20 ml** (Concentración final en el medio 0,167 g l <sup>-1</sup> )	Piridoxina-HCl	20 mg
		Pantotenato cálcico	20 mg
		Inositol	120 mg
<sup>1</sup> Solución stock de sales (100x)	Cantidades	Agua destilada	100 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,61 g		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,55 g		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14,7 g	<sup>3</sup> Solución stock de L-triptófano (50x)	Cantidades
Agua destilada	200 ml	L-triptófano	1,67 g
		Agua destilada	200 ml

\*Se preparan y se guardan a 4 °C. Se agregan al medio antes de esterilizar en autoclave.

\*\* Las soluciones stock de vitaminas y L-triptófano se esterilizan mediante filtro millipore y se guardan a -20 °C. Se añaden al medio una vez autoclavado a una temperatura de 50 °C en condiciones estériles.

### 3.2.4 Determinación de actividad ACC desaminasa

#### 3.2.4.1 Producción de biomasa bacteriana

Se midió la actividad de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa de las cepas bacterianas siguiendo el procedimiento de Penrose y Glick (2003). Los aislamientos bacterianos puros se sembraron primero en medio TSA durante 2 días y luego se transfirieron a placas Petri con medio DF sales (Tabla 2.5), con 0,5 M de ACC (esterilizado por filtración, 300  $\mu$ l por placa) como única fuente de nitrógeno y se incubaron durante 2 días a 28 °C, hasta obtener suficiente masa bacteriana. Las cepas que no crecieron en este medio carecían de actividad ACC desaminasa. La masa bacteriana de cada aislado se resuspendió en 2,5 ml de agua destilada estéril, hasta llegar a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Se tomaron 20  $\mu$ l de cada solución bacteriana y se inocularon en 15 ml de medio TSB. Se incubó toda la noche a 28°C y 200 rpm.

Para rescatar la masa bacteriana producida, se centrifugó a 8.000 g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la masa bacteriana se resuspendió en 7,5 ml de medio mínimo DF sales líquido; se añadieron 45  $\mu$ l de 0,5 M ACC y se incubó toda la noche a 28 °C y 200 rpm. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 8.000 g a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron y resuspendieron en 5 ml de 0,1 M Tris-HCl pH 7,6, se centrifugó de nuevo y se descartó el sobrenadante. El procedimiento de lavado se repitió dos veces con el fin de eliminar restos de medio de cultivo. La masa bacteriana se guardó a 4 °C.

#### 3.2.4.2 Medida de actividad ACC desaminasa

La actividad ACC desaminasa de cada cepa se midió según Honma y Shimomura (1978). La enzima ACC desaminasa cataliza la hidrólisis del ACC, cuyos productos son el  $\alpha$ -ketobutirato y amonio; este procedimiento mide indirectamente la acción de la enzima, ya que se basa en la medición de la producción de  $\alpha$ -ketobutirato.

Cada biomasa bacteriana obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente se resuspendió en 1 ml de 0,1 M Tris-HCl pH 7,6, se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 16.000 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 600  $\mu$ l de 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, se añadieron 30  $\mu$ l de tolueno y se agitó en el vortex durante 30 segundos. El blanco se elaboró a partir de este momento con 600  $\mu$ l de 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 y 30  $\mu$ l de tolueno. Se guardó una alícuota de 100  $\mu$ l de las “células toluenizadas” a 4 °C para la posterior determinación de la actividad proteica.

Se transfirieron 200  $\mu\text{l}$  de las “células toluenizadas” a un tubo eppendorf nuevo, se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de 0,5 M ACC, se agitó el tubo y se incubó a 30 °C durante 15 minutos. Luego se añadió 1 ml de 0,56 M HCl, se agitó y se centrifugó 5 minutos a 16.000 g a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se transfirió a un tubo de ensayo, se agregaron 800  $\mu\text{l}$  de 0,56 M HCl, se agitó y se agregaron 300  $\mu\text{l}$  de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,2% en 2 M HCl), una vez más se agitó toda la mezcla y se incubó a 30 °C por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 2 ml de 2 N NaOH y se midió la OD a 540 nm.

La cantidad de  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -ketobutirato producido se determinó comparando la absorbancia a 540 nm de la muestra con la curva estándar de  $\alpha$ -ketobutirato (Sigma-Aldrich), con concentraciones desde 200-1000  $\mu\text{M}$ . Se preparó una solución madre de  $\alpha$ -ketobutirato a 100 mM diluida en 0.1 M Tris-HCl pH 8,5 y se guardó a 4 °C. A partir de la solución madre, se hizo una solución de 10 mM para su uso inmediato en la preparación de las soluciones para la generación de la curva patrón. Se pusieron 1,8 ml de cada solución (de cada concentración) con 300  $\mu\text{l}$  de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,2% en 2M HCl) y se continuó con los pasos detallados en el párrafo anterior, hasta obtener la OD a 540 nm.

### ***3.2.4.3 Medida de la concentración proteica***

Utilizando el Kit de Bio-Rad Protein Assay (catálogo número 55-0006), basado en el método Bradford (1976), se determinó la concentración de proteína solubilizada. Consiste en la adición del colorante *Coomasie Brilliant Blue G-250* al extracto bacteriano, que toma una coloración azul cuya intensidad depende de la concentración de proteína, y la subsecuente medición a 595 nm en un espectrofotómetro. La comparación con una curva patrón, elaborada en este caso a partir de albúmina de suero bovino (BSA), permite medir por comparación la concentración de proteína en la muestra. La curva se hizo con concentraciones de BSA de 0.1-1 mg  $\text{ml}^{-1}$ , poniendo 50  $\mu\text{l}$  de la solución proteica y 2,5 ml del colorante diluido (1:4) con agua destilada y filtrado a través de papel Whatman nº 1 o equivalente.

Para medir la concentración proteica en las muestras, se utilizó la alícuota de “células toluenizadas” guardadas a 4 °C provenientes de la prueba de ACC desaminasa. Se tomaron 26,5  $\mu\text{l}$  de estas células, se pusieron en un eppendorf y se añadieron 173,5  $\mu\text{l}$  de 0,1 M TrisHCl pH 8 y 200  $\mu\text{l}$  de 0,1 N NaOH, la mezcla se agitó en el vortex. La muestra se hirvió durante 10 minutos al baño maría, se enfrió y se mezcló de nuevo en el vortex. En un tubo de ensayo se agregaron 2 ml del colorante previamente diluido y 40  $\mu\text{l}$  de la muestra, se agitó el tubo y se midió la absorbancia a 595 nm.

Tabla 2.5. Composición y elaboración del medio DF sales libre de nitrógeno (Dworkin y Foster, 1958).

Reactivos	Cantidades
$K_2HPO_4$	4 g
$Na_2HPO_4$	6 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Glucosa	2 g
Ácido glucónico	2 g
Ácido cítrico	2 g
Elementos traza <sup>1</sup>	0,1 ml
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ <sup>2</sup>	0,1 ml
Agua destilada	1000 ml*
<sup>1</sup> Elementos traza** (10000x)	Cantidades
$H_3BO_3$	10 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	11,19 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	124,6 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	78,22 mg
$MoO_3$	10 mg
Agua destilada estéril	100 ml
<sup>2</sup> Solución de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ** (10000x)	Cantidades
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100 mg
Agua destilada estéril	10 ml

\*Ajustar a pH 7,2 y esterilizar en autoclave. Si el medio es sólido, utilizar agar grado A al 1,8% (libre de nitrógeno)

\*\* Guardar a 4 °C.

### 3.2.5 Determinación de la capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno

Para la determinación de la capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno (N) de las cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo “Norris Glucose” (Tabla 2.6) y se elaboraron dos medios diferentes, uno libre de N y otro con una fuente de N ( $NH_4NO_3$ ). Los aislados bacterianos purificados procedentes de TSA se resuspendieron en 2 ml de solución salina al 0,9% ( $1 \times 10^8$  UFC  $ml^{-1}$ ). Para cada aislado, se incubaron 100  $\mu l$  de esta suspensión en viales con 4 ml del medio libre de N y del medio con N. Se incubó durante 3 días en oscuridad a 28 °C y se agitaron 2 veces por día para favorecer su crecimiento. Al finalizar este periodo se

midió la OD a 600 nm de ambos viales, sin N y con N. Se calculó el índice de producción de masa bacteriana dividiendo la OD de la bacteria crecida en medio sin N entre la OD de la bacteria crecida en medio con N.

Tabla 2.6. Composición y elaboración del medio para determinar la capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno.

Medio libre de N		Medio con N	
Reactivos	Cantidades	Reactivos	Cantidades
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	0,2 g	NaCl	0,2 g
Glucosa	4 g	Glucosa	4 g
Manitol	8 g	Manitol	8 g
Piruvato	8 g	Piruvato	8 g
Elementos traza <sup>1</sup>	0,1 ml	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2 g
Vitaminas <sup>2</sup>	800 µl	Elementos traza <sup>1</sup>	0,1 ml
Agua destilada	1000 ml*	Vitaminas <sup>2</sup>	800 µl
		Agua destilada	1000 ml*

<sup>1</sup> Elementos traza** (10000x)	Cantidades	<sup>2</sup> Solución stock de vitaminas***	Cantidades
MnCl <sub>2</sub>	0,991 g	Riboflavina	20 mg
ZnSO <sub>4</sub> .	0,805 g	Ácido P-amino benzoico	20 mg
FeSO <sub>4</sub>	0,235 g	Ácido nicotínico	20 mg
CuSO <sub>4</sub>	0,1275 g	Biotina	20 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0285 g	Tiamina-HCl	20 mg
CoCl <sub>2</sub>	0,119 g	Piridoxina-HCl	20 mg
NaMoO <sub>4</sub>	0,121 g	Pantotenato cálcico	20 mg
KI	0,042 g	Inositol	120 mg
Agua destilada estéril	500 ml	Agua destilada	100 ml

\*Ajustar a pH 7,2 y esterilizar en autoclave.

\*\* Se preparan y se guardan a 4 °C. Se agregan al medio antes de esterilizar en autoclave.

\*\*\* Las solución stock de vitaminas se esteriliza mediante filtro millipore y se guarda a -20 °C. Se añaden al medio una vez autoclavado a una temperatura de 50 °C en condiciones estériles.

### 3.3 Extracción de ADN genómico bacteriano

El ADN de las bacterias se extrajo a partir de masa bacteriana de los aislados, sembrados en medio TSA durante 3 días. La masa se recogió de la placa y se guardó en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se recuperaron entre 200 y 500  $\mu\text{l}$  de masa bacteriana por cepa. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de agua miliQ estéril y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el agua y la muestra se lavó con 200  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa de sarcosil al 0,1%, se centrifugó de nuevo a 12.000 rpm durante 4 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de 0,05 M NaOH al pellet y se calentó a 100 °C durante 4 minutos. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de agua miliQ estéril, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante, se pasó a un tubo eppendorf nuevo y se añadió igual volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó, se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos y la fase superior se transfirió a un nuevo tubo. Se agregó el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó nuevamente por agitación y se centrifugó de la misma forma. De nuevo, la fase superior se pasó a un tubo. El ADN se precipitó agregando acetato de sodio a pH 5,2, (7  $\mu\text{l}$  por cada 100  $\mu\text{l}$ ) y 4 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C. Se mezcló y se refrigeró a -20 °C, durante al menos 12 horas. Después de este tiempo se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet (ADN precipitado) se secó a 37 °C durante 1 hora, posteriormente se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de agua miliQ estéril y se guardó a -20 °C.

### 3.4 Amplificación del ADN para la obtención de perfiles de TP-RAPD

Se utilizaron dos cebadores universales diseñados a partir del gen ribosómico 16S de *Escherichia coli*, con alto contenido de G+C, 879F (5' GCCTGGGGAGTACGGCCGCA 3') y 1522R (5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3') de acuerdo con la metodología descrita por Rivas *et al.* (2002). Para la amplificación se utilizó el AmpliTaq Gold reagent kit (Perkin-Elmer Biosystems, EE.UU). Las reacciones de 25  $\mu\text{l}$  contenían 1x PCR Buffer, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP's, 1,6  $\mu\text{M}$  de cada cebador, BSA 0,04  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ , Taq 0,08 U y 2  $\mu\text{l}$  del ADN molde.

La PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C 10 minutos, 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C 1 minuto; anillamiento a 50 °C 1 minuto y extensión a 72 °C 1 minutos) y extensión final a 72 °C 7 minutos. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa (SeaKem LE, LONZA, USA) al 1,5% utilizando el tampón TBE (Tris-borato-EDTA) (100 mM Tris, 83 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,5). Para la electroforesis se utilizó todo el

producto de la PCR (25  $\mu$ l) junto con 8  $\mu$ l de tampón de carga (40% sacarosa y 0,05% azul de bromofenol). Como marcador se utilizó el DNA Molecular Weight Marker VI (Roche, Alemania) en una dilución 1:4. La electroforesis se ejecutó durante 2 horas aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (Sigma, EE.UU.), de 0,5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, durante 30 minutos y se fotografiaron con luz ultravioleta.

### 3.5 Análisis de los perfiles de RFLP del gen 16S rRNA

Los cebadores usados para la amplificación del 16S rDNA fueron el 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', posiciones de *E. coli* 8-27) y el 1522R (5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3', posiciones de *E. coli* 1509-1522) (Rivas et al., 2002), que amplificaron un fragmento de aproximadamente 1.500 pb (pares de bases); la enzima utilizada para la PCR fue la del kit Go Taq® Flexi DNA polymerase (Promega, USA) en 50  $\mu$ l de reacción. La concentración de los reactivos fue la siguiente: 1X PCR Green Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 0,12  $\mu$ M de cada cebador (8F y 1522R), BSA 0,04  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup>, Taq 0,017 U y 4  $\mu$ l del ADN molde. La PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C 5 minutos, 35 ciclos (desnaturalización a 95 °C 1 minuto; anillamiento a 60 °C 35 segundos y extensión a 72 °C 1,30 minutos) y extensión final a 72 °C 7 minutos. Se comprobó la existencia de una sola banda en las condiciones de electroforesis previamente mencionadas cargando 5  $\mu$ l del producto de la PCR. El resto del producto de la PCR se guardó a -20 °C.

Las enzimas de restricción utilizadas en el análisis de los perfiles de RFLP fueron *BanI*, *EcoRI*, *Hinfi* y *StuI* (Fisher Scientific, USA) y *Sau3AI* (BioLabs, New England). Se pusieron en cada microtubo 6  $\mu$ l del producto de la PCR junto con 0,5  $\mu$ l de la enzima y 0,5  $\mu$ l del tampón de la enzima correspondiente y se dejó digerir durante toda la noche en una estufa a 37 °C. Para el caso de la enzima *Sau3AI*, se variaron las condiciones de digestión. Se puso en cada microtubo 5  $\mu$ l del producto de la PCR junto con 0,5  $\mu$ l de la enzima, 25  $\mu$ l del tampón de la enzima y 3,625  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se incubó durante 1 hora en una estufa a 37 °C. La visualización de las bandas obtenidas tras las digestiones se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (SeaKem LE, LONZA, USA) con tampón TBE cargando directamente en el gel todo el producto de la digestión (7  $\mu$ l), sin añadir tampón de carga ya que está incluido en el Green Buffer (producto de la PCR). Se utilizó el marcador DNA Molecular Weight Marker VI (Roche, Alemania) en una dilución 1:4. El tiempo de duración de cada electroforesis fue de 2 horas y media, aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (Sigma, EE.UU.), de 0,5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, durante 30 minutos y se fotografiaron con luz ultravioleta.

### 3.6 Secuenciación del gen 16S rRNA

La amplificación del gen ribosómico 16S fue realizada con los cebadores 27F y 1492R y la secuenciación con los cebadores 800R y 518F en el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (Amsterdam, Holanda). Las secuencias obtenidas se limpiaron y procesaron con el programa Chromas, se ensamblaron mediante el programa SeqMan II, y se editaron utilizando el programa EditSeq ambos del paquete informático DNA Star. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos EzTaxon-e que contiene las cepas tipo (Kim et al., 2012).

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cepas aisladas

En la Tabla 2.8 se presentan las cepas procedentes del muestreo que abarcó toda la demarcación de las IGP's "Alubia de La Bañeza – León" y "Pimiento de Fresno Benavente". Se aislaron en total 122 cepas endofíticas; 68 procedentes de raíces de alubia y 54 de raíces de pimiento. Un 28% de las cepas endofíticas de alubia fueron aisladas en Riego de la Vega, mientras que del resto de los suelos se aislaron menos cepas, un 24% de ellas en Sueros de Cepeda y un 16% en Villaornate, Pobladura de Pelayo García y en Bercianos del Páramo. En el caso de las cepas endofíticas del pimiento, un 45% se aislaron en San Cristóbal de Entreviñas, un 33% en Micereses y un 22% en Fresno de la Vega (Tabla 2.8).

Estos resultados muestran diferencias en la abundancia de las cepas bacterianas endofíticas en diferentes suelos, pero no parecen correlacionarse con las características de los mismos (Anexo, Tabla A.1) en el caso de la alubia, ya que por ejemplo en Sueros de Cepeda el contenido en materia orgánica y en macronutrientes es muy alto mientras que en Villaornate los suelos son francamente pobres y apenas se encontraron diferencias en los porcentajes de cepas aisladas (Anexo, Tabla A.1). Sin embargo en el caso del pimiento, sí es más alto el número de cepas aisladas en San Cristóbal de Entreviñas cuyos suelos contienen mayores proporciones de materia orgánica que el resto de los suelos de su misma IGP (Anexo, Tabla A.2). No obstante son necesarios estudios más amplios para poder establecer conclusiones sobre la riqueza de las poblaciones endofíticas dependiendo del suelo en el que se cultiven las plantas y cómo puede influir este factor en la producción agrícola.

## 4.2 Análisis de los perfiles de ARDRA

Los perfiles de ARDRA son muy utilizados para el análisis de poblaciones de bacterias endofíticas ya que permite agrupar a los aislados a niveles que van desde género a especie dependiendo de las enzimas utilizadas y del grupo bacteriano analizado (Compant et al., 2011; Loaces et al., 2011; Fürnkranz et al., 2012; de Lyra et al., 2013). Los resultados de los perfiles de ARDRA para las cepas aisladas en este estudio se muestran en la figura 2.1. Se obtuvieron 6 perfiles diferentes utilizando la enzima *BanI*, 5 perfiles utilizando la enzima *EcoRI*, 12 perfiles utilizando la enzima *HinfI*, 14 perfiles utilizando la enzima *Sau3AI* y finalmente, 5 perfiles utilizando la enzima *StuI*. Las combinaciones de los diferentes resultados para cada cepa (Tabla 2.7) permitieron agruparlas en 19 perfiles de ARDRA diferentes.

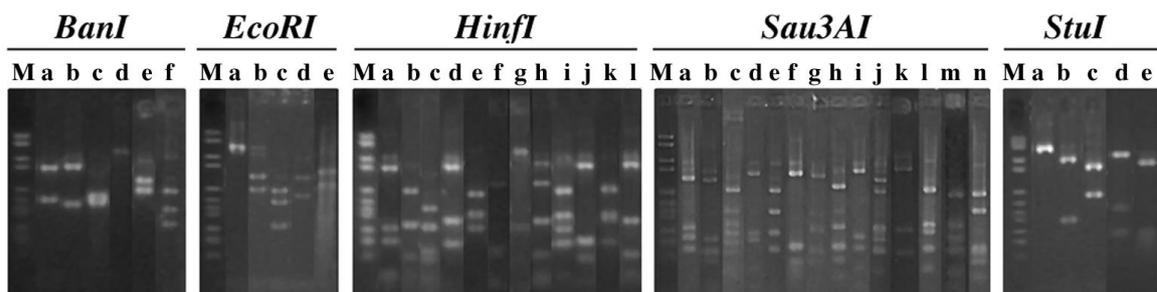


Figura 2.1. Perfiles ARDRA obtenidos con las enzimas *BanI*, *EcoRI*, *HinfI*, *Sau3AI* y *StuI*, en las bacterias endofíticas aisladas de raíces de alubia y pimienta.

Aunque los perfiles de ARDRA son muy útiles para agrupar en un primer paso amplias poblaciones de bacterias, teniendo en cuenta que se originan a partir de un gen muy conservado durante la evolución como es el gen ribosómico 16S, normalmente subestiman la diversidad específica de una población, ya que hay especies con secuencias muy parecidas de este gen e incluso idénticas, como se muestra en este estudio (Tabla 2.7). Por lo tanto, es necesario aplicar otro tipo de técnicas dentro de cada grupo de RFLP para lograr una mayor discriminación a nivel de especie.

Tabla 2.7. Identificación de cepas según ARDRA (Grupo RFLP) y TP-RAPDs.

Cepa	Enzima					Grupo RFLP	Grupo TP	Especie más próxima según el gen 16S	Similitud (%)
	<i>BamI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>				
SCB 2-3+, SCFC 2-1	b	b	a	a	b	I	A	<i>Bacillus soli</i>	99,86
BMA 2-3, BMA 3-2, VCC 3-5, VCV 1-5	b	b	a	a	b	I	B	<i>B. simplex</i>	99,73
FCB 2, FVA 2-4, SCFA 3-2	b	b	a	a	b	I	C	<i>B. simplex</i>	99,93
SCE 2-1	b	b	a	c	a	II	A	<i>B. horneckiae</i>	97,63
SCFA 1-1	d	d	a	f	a	III	A	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	99,79
BSC 1-1, RVSV 3-3, PPSB 1-1, PPSC 1-3, PPSC 2-2, PPSB 2-2, PPSC 3-1, RVPA 3-1, RVPB 3-3	a	b	d	e	b	IV	A	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,62
SLB 2-2, VCC 1-4	a	a	j	d	c	V	A	<i>Pseudomonas orientalis</i>	99,86
VCC 2-1	a	a	j	d	c	V	B	<i>P. reinekei</i>	99,66
SCB 1-1, VCC 3-3, RVSV 1-2, RVSV 1-3, RVSV 1-5	a	a	j	d	c	V	C	<i>P. thivervalensis</i>	99,92
VCV 3-1, VCV 3-3	a	a	j	d	c	V	D	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	99,72
VCV 3-2, RVPB 2-2	a	a	j	d	c	V	E	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	99,85
SLB 2-1, MTA 1-1	b	b	d	a	a	VI	A	<i>B. cereus</i>	99,85
SLB 2-3, SLB 2-4, BMA 3-3, RVSV 1-1, SCFA 2-1, SCFB 1-1	b	b	d	a	a	VI	B	<i>B. mycooides</i>	99,93
SLB 3-1, SCB 1-3	b	b	d	a	a	VI	C	<i>B. cereus</i>	99,8
BLQ 1-2, RVPB 2-3, RVSV 1-4, FCA 2-5, FVA 2-3, SCFA 2-2, MTA 2-2, MTA 2-3	b	b	d	a	a	VI	D	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>	99,93
PPSB 2-3, PPSC 1-1, PPSC 2-1	b	b	d	a	a	VI	E	<i>B. cereus</i>	99,85
RVPA 1-2, SCE 1-2	b	b	d	a	a	VI	F	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99,93
MTA 2-1, MTA 3-2	b	b	d	a	a	VI	G	<i>B. toyonensis</i>	100
SCFC 1-1, SCFC 2-2, SCE 1-1	b	b	d	a	a	VI	H	<i>B. anthracis</i>	99,85

Tabla 2.7. Identificación de cepas según ARDRA y TP-RAPDs (Continuación).

Cepa	Enzima					Grupo RFLP	Grupo TP	Especie más próxima según el gen 16S	Similitud (%)
	<i>BamI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>				
SRN 3-1, SLB 3-2, RVPA 1-3, FVA 1-1, FVA 3-2, SCFA 3-1, SCFB 2-5, SCFB 3-2, SCE 3-1, MMM 3-5, MMM 3-6, MJC 2-1, FCA 1-2	b	b	d	b	a	VII	A	<i>B. aryabhatai</i>	99,78
BLQ 2-1, RVPA 1-1, RVPA 2-1, FVA 3-1	b	b	d	b	a	VII	B	<i>B. aryabhatai</i>	99,26
BLQ 2-2, BLQ 3-1, FVA 2-2	b	b	d	b	a	VII	C	<i>B. aryabhatai</i>	99,53
SCFB 3-3, MMM 1-5	b	b	d	b	a	VII	D	<i>B. aryabhatai</i>	99,85
SRN 2-3, MMM 1-2	b	b	d	c	a	VIII	A	<i>B. marisflavi</i>	100
SCB 2-2, MMM 1-6	b	b	d	c	a	VIII	B	<i>B. marisflavi</i>	100
SRN 3-2	b	b	l	g	a	IX	A	<i>B. oleronius</i>	99,85
SCB 1-2, SCB 4-1	c	b	j	h	b	X	A	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,14
RVPB 1-1, RVPB 2-1, SCE 3-4	c	b	j	h	b	X	B	<i>S. maltophilia</i>	99,11
BMA 1-2	d	d	j	l	a	XI	A	<i>O. thiophenivorans</i>	98,74
VCC 1-3	d	a	j	m	d	XII	A	<i>Phyllobacterium lifriqiyense</i>	100
SCB 2-1	b	c	r	f	b	XIII	A	<i>Achromobacter spanius</i>	100
BSC 1-2	b	c	s	f	b	XIV	A	<i>Achromobacter spiritinus</i>	99,93
FVA 1-2	d	b	g	l	e	XV	A	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	99,78
PPSA 3-1	d	d	g	l	h	XVI	A	<i>R. radiobacter</i>	100
FVA 1-5, BLQ 3-2, PPSA 2-3, VCV 1-4, SCFC 1-2, MMM 2-1	b	b	k	h	a	XVII	A	<i>B. pumilus</i>	99,93
RVPA 1-4, SCFB 2-2, SCFB 3-1, SCFB 3-4, MTA 1-3	b	b	k	h	a	XVII	B	<i>B. siamensis</i>	99,85
FVA 1-3, SCFA 2-3, MMM 3-2	b	b	k	h	a	XVII	C	<i>B. aerophilus</i>	100
SCFA 1-2, MMM 3-4	b	b	k	h	a	XVII	D	<i>B. siamensis</i>	99,85

Tabla 2.7. Identificación de cepas según ARDRA y TP-RAPDs (Continuación).

Cepa	Enzima					Grupo RFLP	Grupo TP	Especie más próxima según el gen 16S	Similitud (%)
	<i>BamI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HinfI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>StuI</i>				
SCFB 2-3, <b>MTA 1-2</b>	b	b	k	h	a	XVII	E	<i>B. safensis</i>	99,92
<b>MTA 3-3</b> , MMM 3-3	b	b	k	h	a	XVII	F	<i>B. altitudinis</i>	100
<b>RVPB 1-2</b> , VCC 1-2	a	b	b	e	b	XVIII	A	<i>E. ludwigii</i>	99,85
<b>RVPB 3-2</b>	a	b	b	e	b	XVIII	B	<i>E. ludwigii</i>	99,93
<b>PPSC 3-5</b>	d	a	g	i	d	XIX	A	<i>R. nepotum</i>	98,61

+En letra azul se han marcado las cepas seleccionadas para la secuenciación del gen ribosómico 16S.

### 4.3 Análisis de los perfiles de TP-RAPD

Los perfiles de TP-RAPD fueron descritos por Rivas et al. (2001) utilizando originalmente los mismos cebadores que permiten la amplificación del gen ribosómico 16S y posteriormente otros cebadores con mayor porcentaje de G+C (Rivas et al., 2002). Estos perfiles permiten diferenciar a niveles taxonómicos de especie y subespecie ya que las cepas que presentan el mismo perfil de TP-RAPD tienen secuencias idénticas en el gen ribosómico 16S, por lo que estos perfiles son muy útiles para agrupar y seleccionar cepas con el objetivo de secuenciar este gen.

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 2.7 y en la figura 2.2.

De acuerdo con los resultados obtenidos algunos grupos de ARDRA corresponden a un solo tipo de TP-RAPD, tal es el caso de los grupos o tipos II, III, IV, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI y XIX (Tabla 2.7, Figura 2.2). Se seleccionó una cepa de cada grupo o tipo de TP-RAPD para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S. El resto de los grupos de ARDRA contenían más de un tipo de TP-RAPD, lo que indica que cada uno de ellos contiene más de una especie y/o subespecie y por lo tanto se seleccionó una cepa representativa de cada uno de los grupos de TP-RAPD obtenidos para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S.

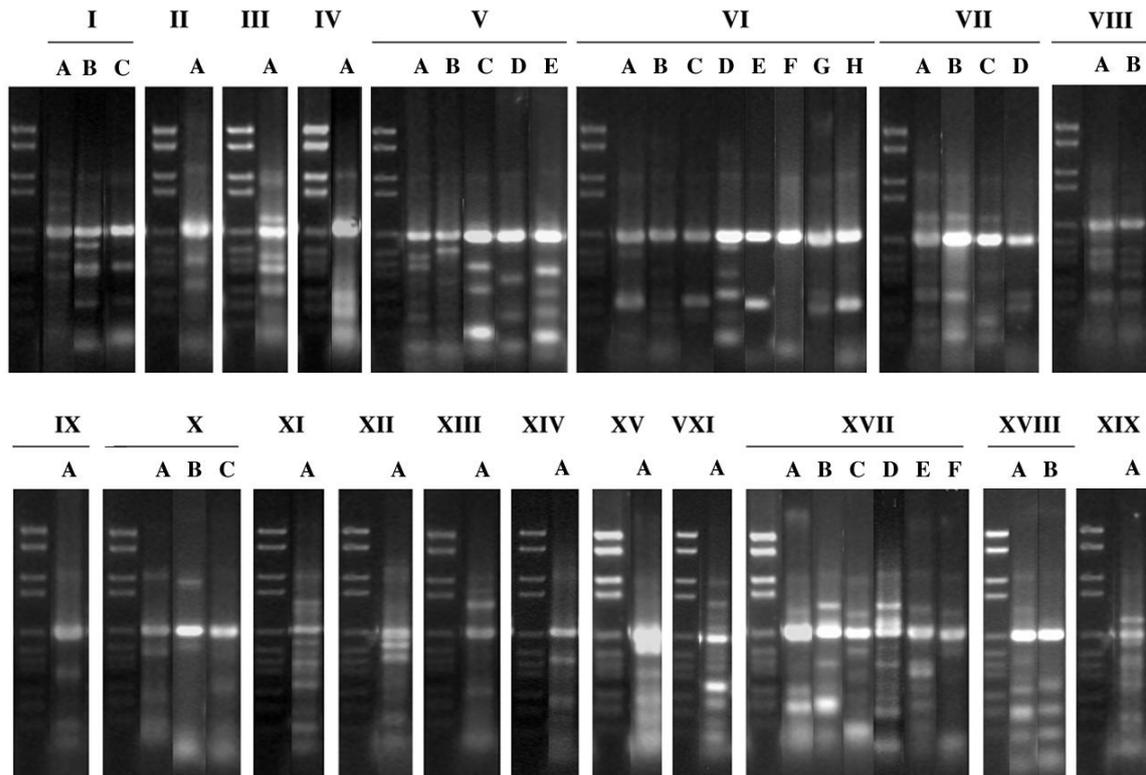


Figura 2.2. Perfiles TP-RAPD (A-H) obtenidos dentro de cada grupo RFLP (I-XIX) en las bacterias endofíticas aisladas de raíces de alubia y pimienta.

#### 4.4 Análisis del gen ribosómico 16S

La clasificación actual de las bacterias se basa en el gen ribosómico 16S (*rrs*) y ha permitido dividir las bacterias en diferentes phyla, clases, órdenes, familias, géneros y especies (Woese, 2001). Aunque, como se ha mencionado en la Introducción de este capítulo, este gen está muy conservado y se puede comparar en taxones muy alejados filogenéticamente, las distancias entre especies de diferentes phyla y clases son muy grandes, por lo que es conveniente analizarlos por separado tal y como se ha hecho en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, que se ha dividido en diferentes volúmenes correspondientes a diferentes phyla. Los resultados del análisis de este gen en las bacterias aisladas en este estudio y seleccionadas de acuerdo con su perfil de ARDRA y de TP-RAPD se recogen en las figuras 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 y en la tabla 2.7.

Del total de cepas seleccionadas en función de sus perfiles de ARDRA y TP-RAPD (Tabla 2.7), 17 cepas fueron clasificadas en el phylum Proteobacteria y 25 cepas en el phylum Firmicutes (Figuras 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6). Estos resultados indican un claro dominio de las cepas Gram positivas sobre las Gram negativas en los endófitos obtenidos en este estudio que también ha sido hallado en una variedad de

pimiento por Rasche et al. (2006) y en semillas de alubia por López-López et al. (2010).

Seis de las cepas del phylum Proteobacteria fueron clasificadas en géneros de la clase alfa Proteobacteria (Figura 2.3), concretamente las cepas SCFA 1-1 y BMA 1-2 dentro del género *Ochrobactrum* de la familia *Brucellaceae*, aunque pertenecientes a grupos filogenéticos dentro de este género que presentan similitudes inferiores al 99% entre ellos. Así, la cepa BMA 1-2 presentó una similitud del 99,8% con respecto a la especie *O. cytisi*. Por el contrario la cepa SCFA 1-1 fue próxima a *R. thiophenivorans* con un 98,7% de similitud, que indica que esta cepa corresponde a una especie no descrita dentro del género *Ochrobactrum*. La cepa VCC 1-3 fue identificada como *P. ifriqiyense* de la familia *Phyllobacteraceae* con un 100% de similitud en el gen ribosómico 16S.

El resto de cepas fueron clasificadas dentro del género *Rhizobium* de la familia *Rhizobiaceae* aunque también pertenecen a grupos filogenéticamente divergentes. La cepa FVA 1-2 presentó un 100% de similitud en el gen ribosómico 16S con respecto a *R. leguminosarum*. Las otras dos cepas pertenecen a un grupo filogenético que anteriormente correspondía al género *Agrobacterium* reclasificado en *Rhizobium* hace algunos años (Young et al., 2001). La cepa PPSA 3-1 presentó un 100% de similitud con *R. radiobacter* (antes *Agrobacterium radiobacter*) y la cepa PPSC 3-5 fue próxima a *R. nepotum*, pero con una similitud muy baja en el gen ribosómico 16S, 98,6%, lo que indica que pertenece a una especie no descrita dentro del género *Rhizobium*.

Sólo dos de las cepas aisladas fueron clasificadas dentro de la clase beta Proteobacteria (Figura 2.4), y más concretamente dentro del género *Achromobacter* de la familia *Alcaligenaceae*, siendo la especie *Achromobacter spanius* la más próxima a la cepa SCB 2-1 con un 100% de similitud en el gen ribosómico 16S y *Achromobacter spiritinus* a la cepa BSC 1-2 con un 99,9% de similitud.

La mayoría de las cepas que se clasificaron dentro del phylum Proteobacteria pertenecían a la clase gamma Proteobacteria (Figura 2.5). Dentro de ellas, cuatro cepas se clasificaron en el género *Pseudomonas* de la familia *Pseudomonadaceae* y fueron próximas a especies de diferentes subgrupos filogenéticos dentro de este género. La cepa RVPB 2-2 fue identificada como *P. brassicaceanum* subsp. *neoaurantiaca* con un 99,9% de similitud en el gen ribosómico 16S. La cepa VCV 3-1 con un 99,7% de similitud fue próxima a la misma subespecie de *P. brassicaceanum*.

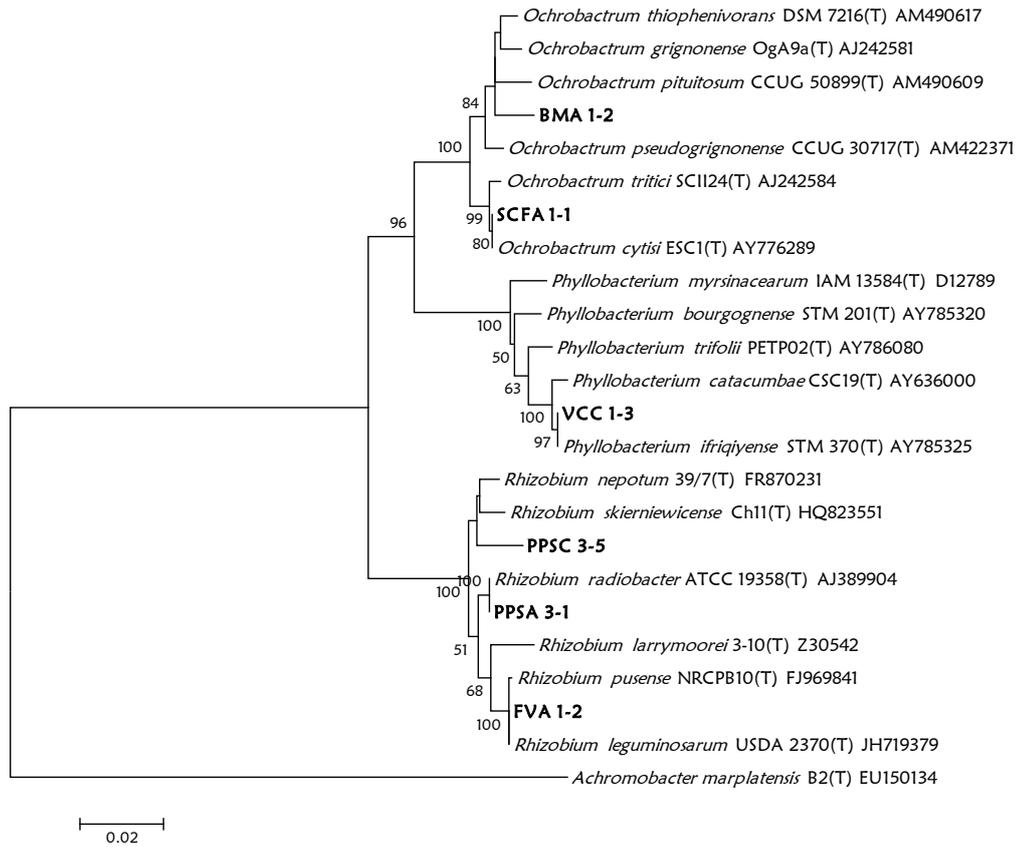


Figura 2.3. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo alfa Proteobacteria. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas.

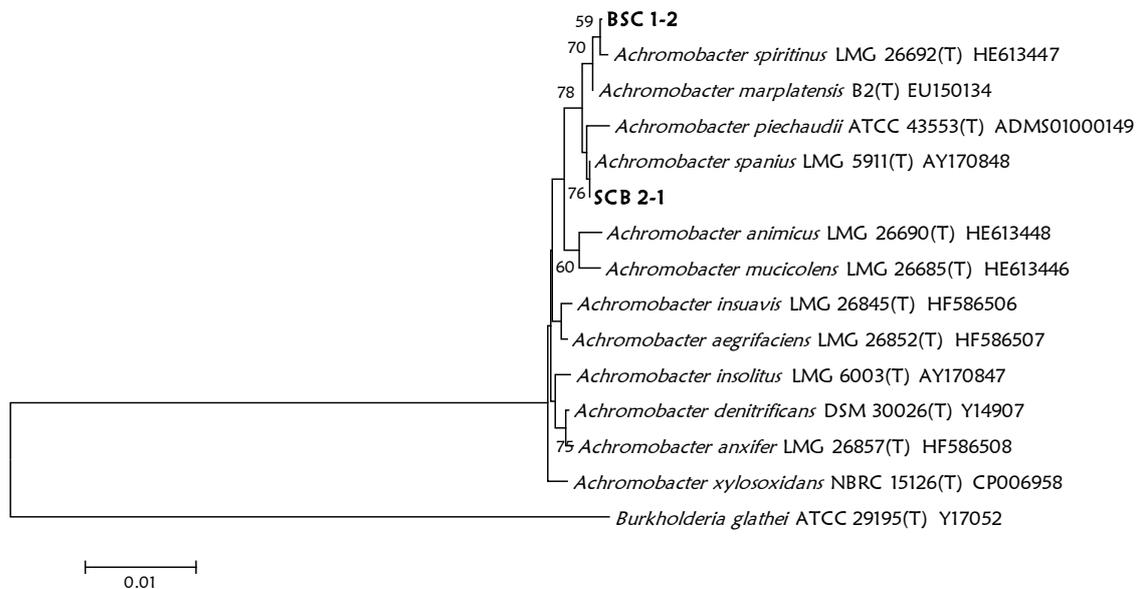


Figura 2.4. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo beta Proteobacteria. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas.

La cepa VCC 3-3 fue identificada como *P. thivervalensis* con un 99,9% de similitud. La cepa VCC 2-1 fue próxima a *P. reinekei* con un 99,7% de similitud.

La mayoría de las cepas que se clasificaron dentro del phylum Proteobacteria pertenecían a la clase gamma Proteobacteria (Figura 2.5). Dentro de ellas, cuatro cepas se clasificaron en el género *Pseudomonas* de la familia *Pseudomonadaceae* y fueron próximas a especies de diferentes subgrupos filogenéticos dentro de este género. La cepa RVPB 2-2 fue identificada como *P. brassicaceanum* subsp. *neaurantiaca* con un 99,9% de similitud en el gen ribosómico 16S. La cepa VCV 3-1 con un 99,7% de similitud fue próxima a la misma subespecie de *P. brassicaceanum*. La cepa VCC 3-3 fue identificada como *P. thivervalensis* con un 99,9% de similitud. La cepa VCC 2-1 fue próxima a *P. reinekei* con un 99,7% de similitud.

Tres cepas fueron clasificadas dentro de la familia *Enterobacteraceae* y concretamente dentro del género *Enterobacter*. Las cepas RVPB 1-2 y RVPB 3-2 fueron muy próximas a *E. ludwigii* con 99,8% y 99,9% de similitud, respectivamente, en el gen ribosómico 16S. La tercera cepa, PPSB 2-2, fue más alejada filogenéticamente, con una similitud también muy alta, 99,6%, aunque no obstante, dada la proximidad filogenética de los miembros de la familia *Enterobacteraceae*, puede pertenecer a una especie diferente, no descrita hasta el momento, al igual que las otras dos cepas, sobre todo la cepa RVPB 1-2.

Las dos últimas cepas de esta clase fueron filogenéticamente próximas a especies del género *Stenotrophomonas* de la familia *Xanthomonadaceae*, siendo la especie más próxima a las cepas RVPB 2-1 y SCB 1-2 la especie *S. maltophilia* con un 99,1% de similitud en el gen ribosómico 16S en ambos casos.

Dentro de las 25 cepas clasificadas en el phylum Firmicutes, 24 fueron clasificadas en el género *Bacillus* de la familia *Bacillaceae* (Figura 2.6). En este género hay diversos subgrupos filogenéticos que contienen especies con secuencias del gen ribosómico 16S casi idénticas. La cepa BLQ 2-2 fue identificada como *B. aryabhatai* con un 99,9% de similitud en el gen ribosómico 16S. Las cepas SCFB 3-3, SRN 3-1 y RVPA 2-1 presentaron 99,5, 99,8 y 99,3% de similitud, respectivamente, con respecto a la misma especie. Las cepas BMA 2-3 y FCB 2 fueron próximas a *B. simplex* con una similitud del 99,73 y 99,93%. La cepa SCB 2-3 fue identificada como *B. soli* con un 99,9% de similitud. La cepa SRN 3-2 fue próxima a la especie *B. oleronius* con un 99,8% de similitud. Las cepas SCB 2-2 y SRN 2-3 fueron identificadas como *B. marisflavi* con un 100% de similitud.

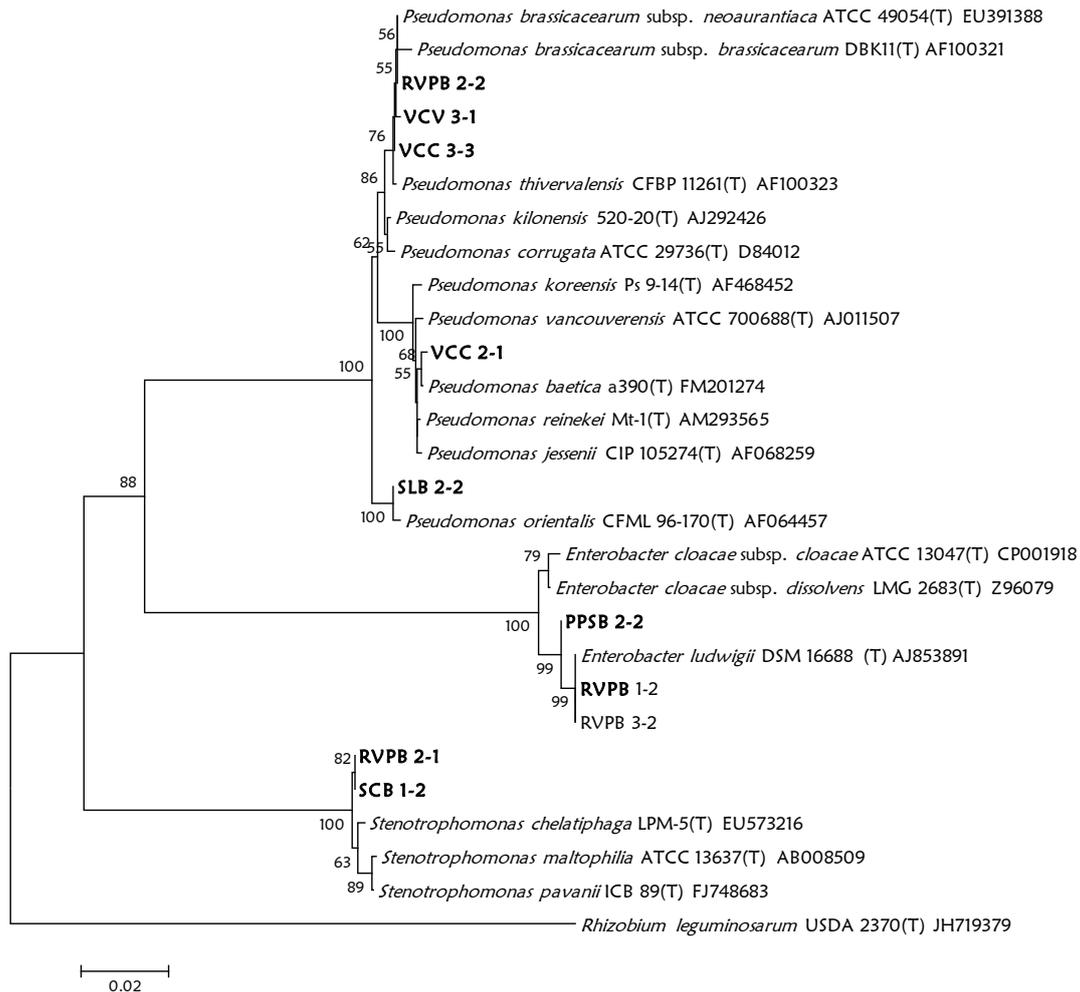


Figura 2.5. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimiento y alubia pertenecientes al grupo gamma Proteobacteria. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas.

La especie más próxima a las cepas SCFA 1-2 y RVPA 1-4 fue *B. siamensis* con 99,8% de similitud. Las cepas FVA 1-5 y MTA 1-2 fueron próximas a *B. pumilus* con un 99,9% de similitud y la cepa a la cepa *B. safensis* con un 99,9% de similitud. Las cepas FVA 1-3 fue identificada como *B. aerophilus* con una similitud del 100%. La cepa MTA 3-3 con *B. altitudinis* con 100% de similitud. La cepa SCFB 1-1 fue próxima a *B. mycoides* con 99,9% de similitud. Las cepas FVA 2-3 y SCFC 2-2 fueron próximas a las especies *B. toyonensis* y *B. turinghiensis* con 99,9% de similitud. Las cepas PPSB 2-3, SLB 2-1, MTA 2-1 y SLB 3-1 fueron próximas a *B. cereus* con un 99,8% de similitud.

La cepa SCE 2-1 fue filogenéticamente divergente de todas las especies de *Bacillus* siendo la más próxima *B. horneckiae* con 97,6% de similitud. Esta cepa representa por lo tanto una nueva especie dentro del género *Bacillus* ya que en este género se

reconocen como diferentes muchas especies con hasta casi el 100% de similitud en el gen ribosómico 16S. Esto indica que algunas de las cepas anteriores, sobre todo aquéllas que presentan menos de un 99,7% de similitud también podrían pertenecer a especies no descritas del género *Bacillus*. Finalmente, la cepa RVPA 1-2 fue clasificada dentro del género *Lysinibacillus* y la especie más próxima fue *Lysinibacillus fusiformis* con 99,9% de similitud en el gen ribosómico 16S.

Teniendo en cuenta todos estos resultados se identificaron 10 géneros de bacterias: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* y *Phyllobacterium*. Todos estos géneros se encontraron en las raíces de la alubia, mientras que en las de pimiento sólo se encontraron seis de éstos, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Rhizobium*, *Lysinibacillus* y *Ochrobactrum*. Por lo tanto la diversidad filogenética de las bacterias endofíticas de raíz fue mayor a nivel de género en las raíces de la alubia que en las de pimiento (Tabla 2.8). El género *Bacillus* fue el predominante, tanto en alubia (29 cepas) como en pimiento (47 cepas). En alubia, además *Pseudomonas* y *Enterobacter*, presentaron una cantidad importante de cepas, 13 y 12 respectivamente mientras que en pimiento la mayoría de cepas aisladas pertenecieron a *Bacillus*.

Todos los géneros de bacterias identificados en este estudio han sido descritos previamente como endófitos (Hallmann y Berg, 2006; Haroim et al., 2008), microorganismos que se encuentran dentro de los órganos de la planta y que no causan efectos negativos en el crecimiento de la planta (Hallmann et al., 1997; Bulgarelli et al., 2013), e incluso estimulan el crecimiento de la planta mediante diferentes mecanismos.

En leguminosas existen pocos estudios sobre caracterización de endófitos, la mayoría de ellos se han realizado en soja, cacahuete y trébol (Sturz et al., 1997; Elvira-Recuenco y Van Vuurde, 2000; Ikeda et al., 2009). López-López et al. (2010) caracterizaron endófitos de alubia, sin embargo sólo algunas cuantas especies coinciden con las especies a las que fueron próximas las cepas de este estudio como ocurre con *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. simplex*, aunque en ambos estudios *Bacillus* fue el género que presentó mayor diversidad de especies. En pimiento también se han realizado pocas investigaciones con respecto a endófitos. Rasche et al. (2006) y Sziderics et al. (2007) encontraron especies de *Bacillus*. El hecho de que no todas las especies encontradas en esta investigación se hayan identificado antes en alubia o pimiento pero sí en otros hospedadores, refuerza la idea de que la diversidad depende en mayor medida de los suelos que del hospedador (McInroy y Klopper, 1995; Rashid et al., 2012).

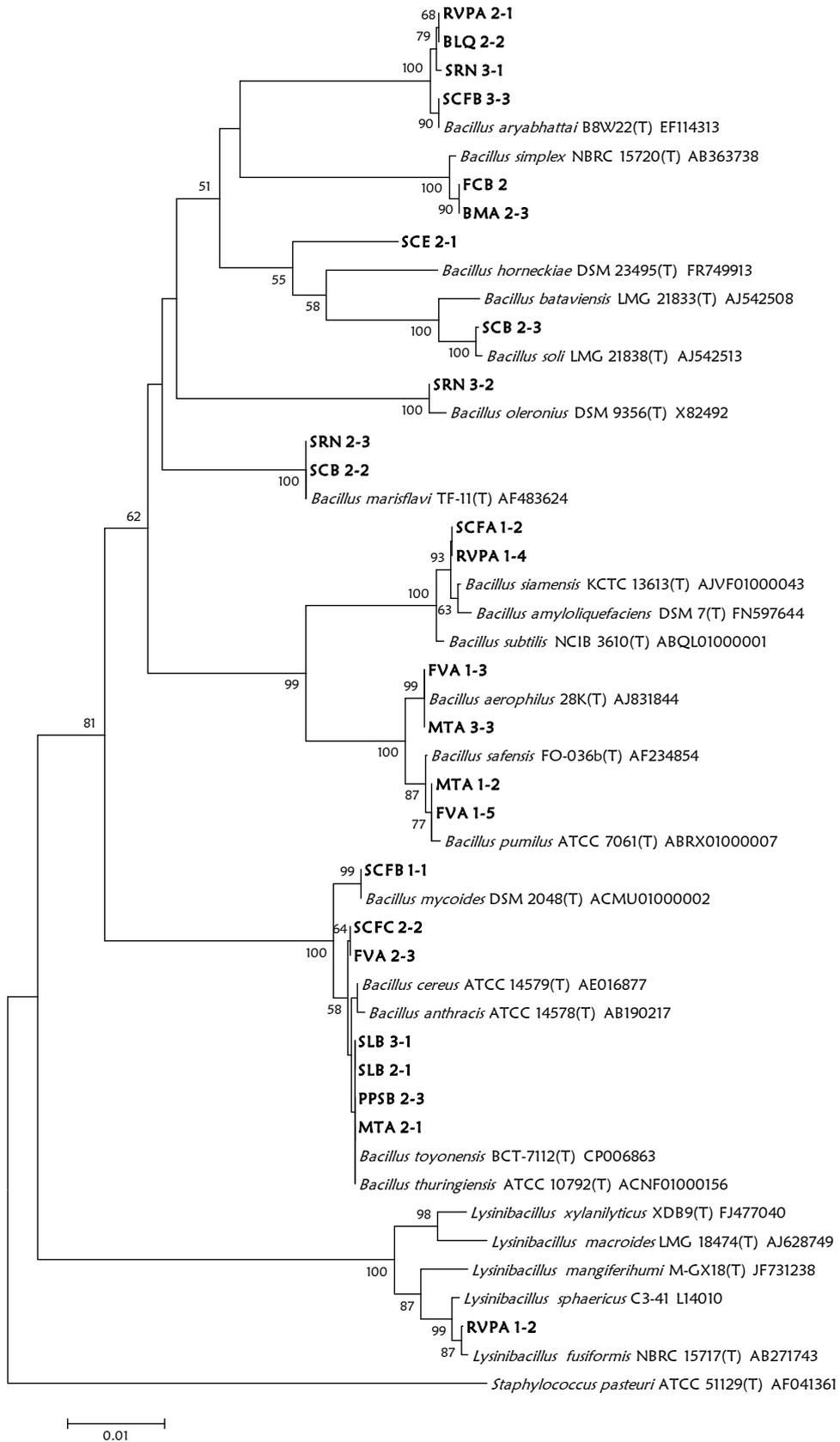


Figura 2.6. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas rizosféricas aisladas de pimienta y alubia pertenecientes al grupo Bacilli. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2 parámetros basándose en 1000 réplicas.

Tabla 2.8. Cepas de bacterias endofíticas aisladas según cultivo, sitio de muestreo y género.

Total	Alubia														Género	Pimiento									Total	
	Sitio de muestreo (Código)															Sitio de muestreo (Código)										
	SRN	SLB	SCB	BSC	BMA	BLQ	PPSA	PPSB	PPSC	VCC	VCV	RVPA	RVPB	RVSV	FCA	FCB	FVA	SCFA	SCFB	SCFC	SCE	MTA	MMM	MJC		
29	3	5	3		1	5	1	1	2		1	4	1	2	<i>Bacillus</i>	2		7	5	8	4	3	8	9	1	47
13		1	1							3	3		2	3	<i>Pseudomonas</i>							1				1
12				1				2	3	1		1	3	1	<i>Enterobacter</i>											0
4					2					1	1				<i>Brevibacterium</i>	1	1	1								3
2							1		1						<i>Rhizobium</i>			1								1
3			2										1		<i>Stenotrophomonas</i>											0
2			1	1											<i>Achromobacter</i>											0
1												1			<i>Lysinibacillus</i>							1				1
1					1										<i>Ochrobactrum</i>			1								1
1										1					<i>Phyllobacterium</i>											0
68	3	6	7	2	4	5	2	3	6	6	5	6	7	6	<b>Total</b>	2	1	9	7	8	4	5	8	9	1	54
<b>Número y porcentaje de cepas endofíticas por localidad</b>	16 (24%)				11 (16%)		11 (16%)		11 (16%)		19 (28%)				12 (22%)			24 (45%)			18 (33%)			<b>Número y porcentaje de cepas endofíticas por localidad</b>		

#### 4.5 Análisis de las capacidades como PGPR de las cepas aisladas

Se analizó la producción de sideróforos y la solubilización de fosfato, los niveles de producción de IAA, actividad ACC desaminasa y la capacidad de crecer en medio libre de N para las 122 cepas endofíticas aisladas (Figura 2.7).

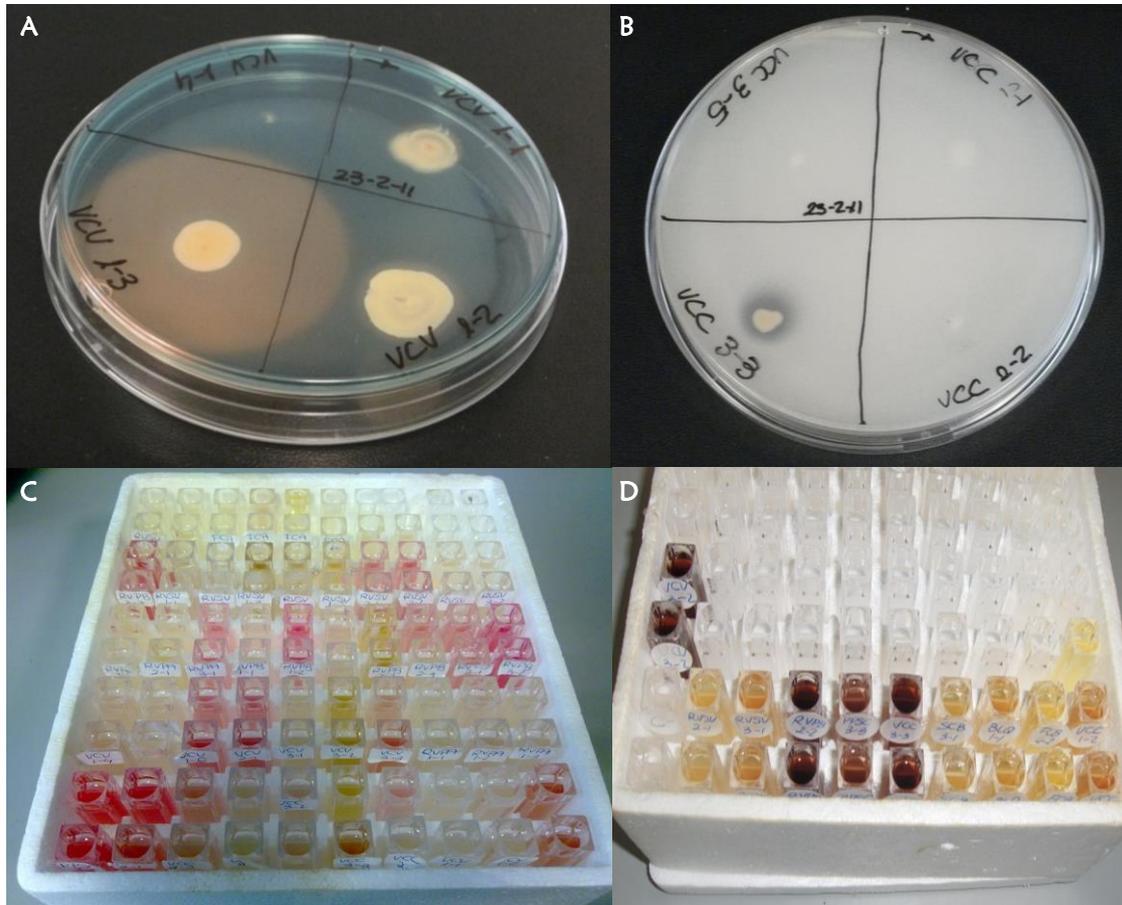


Figura 2.7. Pruebas PGP. A. Cepa productora de sideróforos. B. Cepa solubilizadora de fosfato. C. Prueba colorimétrica de producción de IAA. D. Prueba colorimétrica de producción de  $\alpha$ -ketobutirato (Actividad ACC desaminasa).

Los resultados de las pruebas PGP *in vitro* realizadas a las cepas endofíticas indicaron que el 48% del total de las cepas aisladas produjeron sideróforos, mientras que solamente el 14% mostraron la capacidad de solubilizar fosfato. Este bajo porcentaje de cepas solubilizadoras de fosfato concuerda con lo descrito por otros autores (Beneduzi et al., 2008; Hameeda et al., 2008; Ambrosini et al., 2012).

El análisis por cultivo indica que el 53% de las cepas aisladas de alubia y el 43% de las aisladas en pimiento produjeron sideróforos, porcentajes que aunque mayores en alubia son similares. El porcentaje de cepas que solubilizaron fosfatos fue mucho mayor en alubia (26%), que en pimiento (1,8%). Para el resto de las pruebas PGP los mejores resultados se encontraron también en alubia, de hecho

las 10 mejores productoras de IAA correspondieron a cepas aisladas en este cultivo.

En las Tablas 2.9 y 2.10 se muestran los resultados obtenidos para las mejores cepas aisladas que mostraron alguna actividad PGP *in vitro* y en la tabla A.5, anexo, se muestran los resultados totales de las puebas PGP *in vitro*.

Tabla 2.9. Resultados de las mejores cepas de rizobacterias endofíticas productoras de sideróforos y solubilizadoras de P.

Código de la cepa	Producción de sideróforos		Solubilización de P (Diámetro del halo mayor de 5 mm)	
	Diámetro del halo (mm)	Especie más próxima según el gen 16S	Código de la cepa	Especie más próxima según el gen 16S
VCV 3-2	16	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	SRN 3-2	<i>B. oleronius</i>
RVSV 1-2	14	<i>P. thivervalensis</i>	SLB 2-1	<i>B. cereus</i>
SLB 2-2	12	<i>P. orientalis</i>	SLB 2-2	<i>P. orientalis</i>
VCV 3-3	12	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	SCB 1-1	<i>P. thivervalensis</i>
RVSV 1-3	12	<i>P. thivervalensis</i>	BLQ 1-2	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>
SCFB 3-1	12	<i>B. siamensis</i>	PPSB 2-2	<i>E. ludwigii</i>
SCFC 1-1	12	<i>B. anthracis</i>	PPSB 2-3	<i>B. cereus</i>
SLB 2-3	11	<i>B. mycooides</i>	VCC 1-3	<i>P. lifriqiense</i>
VCC 1-4	11	<i>P. orientalis</i>	VCC 1-4	<i>P. orientalis</i>
VCV 1-5	11	<i>B. simplex</i>	VCC 3-3	<i>P. thivervalensis</i>
VCV 3-1	11	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	VCV 3-1	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
FCB 2	11	<i>B. simplex</i>	VCV 3-3	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
SCFC 2-1	11	<i>B. soli</i>	RVPB 1-1	<i>S. maltophilia</i>
VCC 2-1	10	<i>P. reinekei</i>	RVPB 1-2	<i>E. ludwigii</i>
SRN 3-1	9	<i>B. aryabhatai</i>	RVPB 2-1	<i>S. maltophilia</i>
PPSA 3-1	9	<i>R. radiobacter</i>	RVPB 2-2	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
VCC 3-5	9	<i>B. simplex</i>	RVPB 2-3	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>
RVPB 2-2	9	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>	RVSV 3-3	<i>E. ludwigii</i>
FVA 1-2	9	<i>R. leguminosarum</i>	MMM 3-5	<i>B. aryabhatai</i>

Tabla 2.10. Resultados de las mejores cepas de rizobacterias endofíticas productoras de IAA, con actividad ACC desaminasa y con capacidad para crecer en medio libre de N.

Producción de IAA			Actividad ACC desaminasa			Crecimiento en medio libre de N		
Código de la cepa	$\mu\text{g } 10^{-8}$ UFC	Especie más próxima según el gen 16S	Código de la cepa	$\mu\text{mol ACC mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Especie más próxima según el gen 16S	Código de la cepa	D.O.	Especie más próxima según el gen 16S
RVPB 3-3	11,41	<i>E. ludwigii</i>	VCC 3-3	449,81	<i>P. thivervalensis</i>	RVSV 1-4	0,78	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>
RVPB 1-2	10,73	<i>E. ludwigii</i>	RVSV 1-3	386,05	<i>P. thivervalensis</i>	SRN 3-2	0,76	<i>B. oleronius</i>
RVPB 3-2	10,28	<i>E. ludwigii</i>	RVSV 1-5	374,85	<i>P. thivervalensis</i>	SLB 3-1	0,71	<i>B. cereus</i>
PPSB 2-2	10,10	<i>E. ludwigii</i>	RVSV 1-2	330,29	<i>P. thivervalensis</i>	SCFB 1-1	0,70	<i>B. mycooides</i>
BSC 1-1	8,65	<i>E. ludwigii</i>	RVPB 2-2	259,21	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>	SLB 3-2	0,69	<i>B. aryabhatai</i>
PPSB 2-3	8,63	<i>B. cereus</i>	FVA 1-2	247,14	<i>R. leguminosarum</i>	SCFA 2-2	0,58	<i>B. toyonensis/Thuringiensis</i>
VCV 3-1	8,41	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>	VCV 3-2	178,85	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>	PPSB 2-3	0,45	<i>B. cereus</i>
PPSC 1-1	7,42	<i>B. cereus</i>	SLB 3-2	131,41	<i>B. aryabhatai</i>	FCA 2-5	0,45	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>
SCB 1-1	7,12	<i>P. thivervalensis</i>	SRN 3-1	121,17	<i>B. aryabhatai</i>	BSC 1-2	0,44	<i>Achromobacter spiritinus</i>
PPSC 1-3	6,94	<i>E. ludwigii</i>	SCFA 3-1	102,55	<i>B. aryabhatai</i>	PPSC 1-1	0,43	<i>B. cereus</i>
RVPA 3-1	6,78	<i>E. ludwigii</i>	MMM 3-4	93,16	<i>B. siamensis</i>	RVPB 1-1	0,41	<i>S. maltophilia</i>
VCV 3-2	6,05	<i>P. brassicaceanum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>	SCFB 3-3	78,42	<i>B. aryabhatai</i>	BMA 2-3	0,34	<i>B. simplex</i>
SCFB 1-1	5,88	<i>B. mycooides</i>	FVA 3-2	75,28	<i>B. aryabhatai</i>	SLB 2-1	0,31	<i>B. cereus</i>
PPSB 1-1	5,79	<i>E. ludwigii</i>	SCFB 3-2	73,06	<i>B. aryabhatai</i>	RVPB 2-3	0,31	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>

Tabla 2.10. Resultados de las mejores cepas de rizobacterias endofíticas productoras de IAA, con actividad ACC desaminasa y con capacidad para crecer en medio libre de N. (Continuación)

Producción de IAA			Actividad ACC desaminasa			Crecimiento en medio libre de N		
Código de la cepa	$\mu\text{g } 10^{-8}$ UFC	Especie más próxima según el gen 16S	Código de la cepa	$\frac{\mu\text{mol ACC}}{\text{mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}}$	Especie más próxima según el gen 16S	Código de la Cepa	D.O.	Especie más próxima según el gen 16S
FVA 1-2	5,70	<i>R. leguminosarum</i>	RVPA 1-1	66,61	<i>B. aryabhatai</i>	FVA 2-3	0,30	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>
SLB 2-2	4,75	<i>P. orientalis</i>	SCB 2-1	61,39	<i>Achromobacter spanius</i>	PPSC 3-1	0,29	<i>E. ludwigii</i>
RVPA 1-2	4,53	<i>L. fusiformis</i>	BLQ 2-2	51,75	<i>B. aryabhatai</i>	PPSC 3-5	0,29	<i>R. nepotum</i>
PPSC 2-2	4,41	<i>E. ludwigii</i>	MMM 3-6	51,37	<i>B. aryabhatai</i>	VCC 1-3	0,25	<i>P. lifriqiyense</i>

La experiencia acumulada en la investigación realizada sobre PGPR demuestra que esta actividad no está correlacionada con la fertilidad del suelo, ni con la ausencia de fertilización química, ni con las prácticas agronómicas (Jesús Caballero Mellado, comunicación personal).

El análisis de las propiedades PGP por género (Figura 2.8) indica que las especies de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* fueron las mejores en todas las pruebas, excepto para la solubilización de fosfato. En este caso, la mayoría de solubilizadoras de fosfato fueron las cepas pertenecientes a especies del género *Pseudomonas* (7), aunque por una mínima diferencia, seguidas por las cepas de *Bacillus* (6).

Las mejores productoras de sideróforos fueron *Bacillus* (33), seguidas de *Pseudomonas* (12) y *Enterobacter* (9). Las mayores productoras de IAA fueron *Bacillus* (14), *Enterobacter* (11) y *Pseudomonas* (10). Por su parte, la gran mayoría de cepas que mostraron actividad ACC desaminasa fueron *Bacillus* (24), seguidas de *Pseudomonas* (10) y finalmente las que mejor crecieron en medio libre de nitrógeno fueron *Bacillus* (29), seguidas de *Enterobacter* (3) (Figura 2.8).

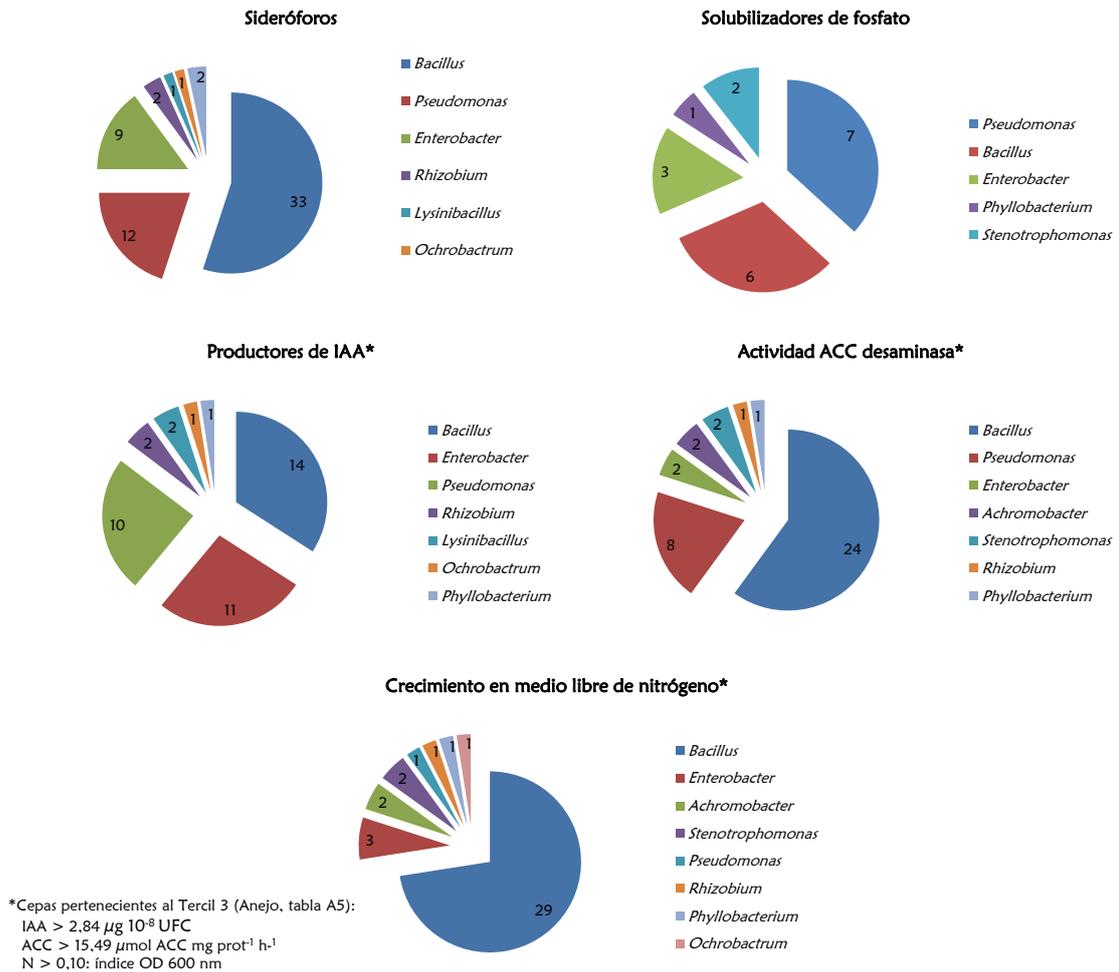


Figura 2.8. Número de cepas aisladas (según género) de acuerdo con sus capacidades PGP *in vitro*: producción de sideróforos, solubilización de fosfato, producción de IAA, actividad ACC desaminasa y crecimiento en medio libre de nitrógeno.

Muchas de las cepas de los géneros aislados han sido descritas como PGPR en diferentes cultivos (Ding et al., 2005; Tilak et al., 2006; Raddadi et al., 2008; Çakmakçı et al., 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Ryan et al., 2009; Shoebitz et al., 2009; Dary et al., 2010; Vendan et al., 2010; Trivedi et al., 2011; Zhang et al., 2011, Ambrosini et al., 2012; Bhattacharyya y Jha, 2012; Rashid et al., 2012; Siddikee et al., 2012). No obstante, hay pocos estudios específicos en alubia y pimiento en los que se haya hecho un estudio sobre características PGPR de bacterias endofíticas aisladas de estos cultivos. Al respecto, Sziderics et al. (2007) aislaron cepas de *Bacillus* sp. provenientes de raíces de pimiento con actividad ACC desaminasa.

Como se observa en las tablas 2.9 y 2.10 se obtuvieron varias especies de cepas en cada una de las pruebas PGP *in vitro*.

En la producción de sideróforos (Tabla 2.9), las mejores cepas productoras correspondieron en su mayoría a especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Las cuatro mejores correspondieron a especies de *Pseudomonas*, entre ellas *P. brassicaceanum* subsp. *neoaurantiaca*, *P. orientalis* y *P. thivervalensis*; y entre las especies de *Bacillus* buenas productoras de sideróforos se encuentran: *B. siamensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* y *B. simplex*. Ambos géneros, *Bacillus* y *Pseudomonas* se han reportado como productores de sideróforos (Sharma et al., 2003; Patel et al., 2009).

Al igual que en las productoras de sideróforos, las mejores cepas solubilizadoras de fosfato correspondieron a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Tabla 2.9), que junto con otros géneros como *Azotobacter*, *Burkholderia* o *Enterobacter*, han sido reportados como los más significantes géneros con cepas solubilizadoras de fosfato (Sturz y Nowak, 2000; Mehnaz y Lazarovits, 2006).

Como se observa en la tabla 2.10, las mejores cepas productoras de IAA fueron las correspondientes a *E. ludwigii*. Otros informes indican que esta especie es una buena productora de IAA (Shoebitz et al., 2009; Gopalakrishnan et al., 2011). También se encontraron cepas de *P. brassicaceanum* subsp. *neoaurantiaca*, *P. thivervalensis* y *B. cereus*, entre otras especies.

Por otro lado, la actividad ACC desaminasa estuvo encabezada por cuatro cepas de *P. thivervalensis* cuya actividad ACC desaminasa ha sido reportada por otros autores (Zhang et al., 2011; Shahzad et al., 2013). Asimismo, destacan varias cepas de la especie *B. aryabhatai* (Tabla 2.10), especie también reportada anteriormente por Siddique et al. (2012) con actividad ACC desaminasa.

Finalmente, entre las mejores cepas capaces de crecer en medio libre de nitrógeno destacan especies del género *Bacillus*, entre ellas *B. toyonensis/thuringiensis*, *B. oleronius*, *B. cereus* y *B. mycoides* (Tabla 2.10). En este sentido, Beneduzi y Passaglia (2011) indican que el género *Bacillus* y *Paenibacillus* incluyen las mejores especies fijadoras de nitrógeno, tienen un gran potencial para la producción de sideróforos y para la solubilización de fosfato.

## 5 REFERENCIAS

- Alexander, D., y Zuberer, D. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39-45.
- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F. G., Vargas, L. K., y Passaglia, L. M. (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil*, 356(1-2), 245-264.
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., y Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 204(1), 57-67.
- Azziz, G., Bajsa, N., Haghjou, T., Taulé, C., Valverde, Á, Igual, J. M., y Arias, A. (2012). Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 61, 320-326.
- Barea, J., y Brown, M. E. (1974). Effects on plant growth produced by azotobacter paspali related to synthesis of plant growth regulating substances. *Journal of Applied Microbiology*, 37(4), 583-593.
- Barea, J. M, Azcón. R., y Azcón-Aguilar, C. (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. En: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., y Hampp, R. (eds). *Plant surface microbiology*. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany.
- Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A., y Mañero, F. J. G. (2008). Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). En: Ahmad, I., Pichtel, J., y Hayat, S. (eds). *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese-Zanettini, M. H., y Passaglia, L. M. P. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39(3), 311-320.
- Beneduzi, A., y Passaglia, L. M. (2011). Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting Bacilli. En: Maheshwari, D. K. (ed). *Bacteria in agrobiology: Plant growth responses* Springer-Verlag, Heidelberg.

- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., . . . Passaglia, L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the south of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63, 94-104.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., y Bakker, P.A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 478-486.
- Bhattacharyya, P., y Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bleecker, A. B., y Kende, H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 1-18.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, Emiel Ver Loren, y Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807-838.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Oral, B., Erdogan, Ü, y Şahin, F. (2009). Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole-3-acetic acid-producing rhizobacteria. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(4), 375-380.
- Choi, O., Kim, J., Kim, J., Jeong, Y., Moon, J. S., Park, C. S., y Hwang, I. (2008). Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology*, 146(2), 657-668.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., y Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*, 62(1), 188-197.
- Dary, M., Chamber-Pérez, M., Palomares, A., y Pajuelo, E. (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1), 323-330.
- de Lyra, M., Santos, D., Mondragon-Jacobo, C., da Silva, M., Mergulhão, A., y Martínez-Romero, E. (2013). Isolation and molecular characterization of

- endophytic bacteria associated with the culture of forage cactus (*Opuntia* spp.). *Journal of Applied Biology y Biotechnology*, 1(01), 011-016.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., y Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing Bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1271-1281.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., y Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107-149.
- Dworkin, M., y Foster, J. W. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75, 592-601.
- Elvira-Recuenco, M., y Van Vuurde, J. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(11), 1036-1041.
- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L. M. C., Toffanin, A., Tagliasacchi, A. M., y Nuti, M. (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.
- Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M., y Berg, G. (2012). Microbial diversity inside pumpkins: Microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microbial Ecology*, 63(2), 418-428.
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M., Flores-Félix, J., Fernández, M. T., . . . Martínez-Molina, E. (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.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., y Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 329-39.
- Glick, B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012, 1-15.
- Gopalakrishnan, S., Humayun, P., Kiran, B. K., Kannan, I. G. K., Vidya, M. S., Deepthi, K., y Rupela, O. (2011). Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by

- Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(6), 1313-1321.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., y Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43(10), 895-914.
- Hallmann, J., y Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. En: Schulz, B. J. E., Boyle, C. J. C., y Sieber, T. N. (eds). Microbial root endophytes. Springer, Berlin.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, S., y Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological Research, 163(2), 234-242.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., y Elsas, J. D. v. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology, 16(10), 463-471.
- Honma, M., y Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agric Biol Chem, 42, 1825-1831.
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., . . . Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology, 148(7), 2097-2109.
- Ikeda, S., Okubo, T., Kaneko, T., Inaba, S., Maekawa, T., Eda, S., . . . Minamisawa, K. (2009). Community shifts of soybean stem-associated bacteria responding to different nodulation phenotypes and N levels. The ISME Journal, 4(3), 315-326.
- Ke, F., Hai-Ming, L., SHENG, H., Xiao-Li, W., y Jian, M. (2004). Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils. Pedosphere, 14, 85-92.
- Khalid, A., Arshad, M., y Zahir, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology, 96(3), 473-480.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., . . . Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(Pt 3), 716-721.

- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., y Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885-886.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., y Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2), 39-44.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., y Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1244-1251.
- Loaces, I., Ferrando, L., y Scavino, A. F. (2011). Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microbial Ecology*, 61(3), 606-618.
- López-López, A., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., y Martínez-Romero, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 322-327.
- Ludwig, W., y Schleifer, K. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2), 155-173.
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Lynch, J. M. (1990). En: Lynch J. M. (Ed), *The rizosphere*. Wiley-interscience. Chichester, UK.
- Mcinroy, J. A., y Kloepper, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173(2), 337-342.
- Mehnaz, S., y Lazarovits, G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, 51(3), 326-335.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H., y Tebbe, C. (2000). Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*, 40(1), 43-56.
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., y Sicardi, M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting

- bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21-28.
- Moutia, J. Y., Saumtally, S., Spaepen, S., y Vanderleyden, J. (2010). Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil*, 337(1-2), 233-242.
- Neilands, J. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26723-26726.
- Nocker, A., Burr, M., y Camper, A. K. (2007). Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54(2), 276-289.
- Noel, T., Sheng, C., Yost, C., Pharis, R., y Hynes, M. (1996). *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: Direct growth promotion of canola and lettuce. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 279-283.
- O'Hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., y Glenn, A. R. (1989). Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1870-1876.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., y Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annual Reviews in Microbiology*, 40(1), 337-365.
- Oren, A., y Garrity, G. M. (2014). Then and now: A systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 43-56.
- Patel, A. K., Deshattiwar, M. K., Chaudhari, B. L., y Chincholkar, S. B. (2009). Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology*, 100(1), 368-373.
- Penrose, D. M., y Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10-15.
- Raddadi, N., Cherif, A., Boudabous, A., y Daffonchio, D. (2008). Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Annals of Microbiology*, 58(1), 47-52.
- Rasche, F., Trondl, R., Naglreiter, C., Reichenauer, T. G., y Sessitsch, A. (2006). Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes

- colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Canadian Journal of Microbiology, 52(11), 1036-1045.
- Rashid, S., Charles, T. C., y Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Applied Soil Ecology, 61, 217-224.
- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F., y Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. Electrophoresis, 22(6), 1086-1089.
- Rivas, R., Velázquez, E., Palomo, J. L., Mateos, P. F., García-Benavides, P., y Martínez-Molina, E. (2002). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. European Journal of Plant Pathology, 108(2), 179-184.
- Rodríguez, H., y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology advances, 17, 19-339.
- Rosas, S. B., Avanzini, G., Carlier, E., Pasluosta, C., Pastor, N., y Rovera, M. (2009). Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. Soil Biology and Biochemistry, 41(9), 1802-1806.
- Rosselló-Mora, R., y Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 25(1), 39-67.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., y Dow, J.M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nature Reviews Microbiology 7, 514-525.
- Schoenborn, L., Yates. P. S., Grinton, B. E., Hugenholtz, P., Janssen, P. H. (2004). Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4363-4366.
- Shahzad, S. M., Arif, M. S., Riaz, M., Iqbal, Z., y Ashraf, M. (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, A., Johri, B., Sharma, A., y Glick, B. (2003). Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35(7), 887-894.
- Shoebitz, M., Ribaudó, C. M., Pardo, M. A., Cantore, M. L., Ciampi, L., y Curá, J. A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1768-1774.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., y Sa, T. (2012). Regulation of ethylene biosynthesis under salt stress in red pepper (*Capsicum annuum* L.) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-producing halotolerant bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(2), 265-272.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M. C., . . . Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 3), 1043-1047.
- Sturz, A., Christie, B., Matheson, B., y Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13-19.
- Sturz, A., & Nowak, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15(2), 183-190.
- Sylvester-Bradley, R., Asakawa, N., La Torraca, S., Magalhães, F., Oliveira, L., & Pereira, R. (1982). Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. *Acta Amazonica*, 12(1), 15-22.
- Sziderics, A., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., & Wilhelm, E. (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 53(11), 1195-1202.
- Tilak, K., Ranganayaki, N., & Manoharachari, C. (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and

nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, 57(1), 67-71.

- Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kampfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 1), 249-266.
- Trivedi, P., Spann, T., & Wang, N. (2011). Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial Ecology*, 62(2), 324-336.
- Velázquez, E., Rojas, M., Lorite, M. J., Rivas, R., Zurdo-Piñeiro, J. L., Heydrich, M., & Bedmar, E. J. (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*, 48(2), 118-124.
- Vendan, R. T., Yu, Y. J., Lee, S. H., & Rhee, Y. H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *The Journal of Microbiology*, 48(5), 559-565.
- Woese, C., Stackebrandt, E., Weisburg, W., Paster, B., Madigan, M., Fowler, V., . . . Neelson, K. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(3), 315-326.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271.
- Woese, C. R. (2001). Translation: In retrospect and prospect. *RNA* (New York, N.Y.), 7(8), 1055-1067.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de lajodie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 1), 89-103.
- Zhang, Y., He, L., Chen, Z., Wang, Q., Qian, M., & Sheng, X. (2011). Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 83(1), 57-62.



**EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS EN PLANTA PARA  
DETERMINAR SU CAPACIDAD COMO PROMOTORES DE  
CRECIMIENTO**



## 1 INTRODUCCIÓN

Los biofertilizantes se definen como sustancias que contienen microorganismos vivos y que al aplicarse a la planta promueven su crecimiento aumentando la absorción o disponibilidad de nutrientes (Vessey, 2003). Las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (hongos AM) son grupos de microorganismos que pueden ser utilizados como biofertilizantes. Los hongos micorrícicos establecen una relación simbiótica con las raíces de la mayoría de las plantas, pueden encontrarse en prácticamente todos los ecosistemas e intervienen principalmente en la provisión de nutrientes minerales a la planta, tales como fósforo, amonio, zinc y cobre (Barea et al., 2005). Diversos estudios han demostrado que la aplicación de hongos AM resulta beneficiosa para las plantas, puesto que incrementan la tolerancia de las plantas a diferentes estreses abióticos como alta salinidad (Wu et al., 2010; Estrada et al., 2013), presencia de metales pesados (del Val et al., 1999) o condiciones de sequía (Tian et al., 2013). Asimismo, los hongos AM reducen la necesidad de aplicaciones de fertilizantes fosfatados debido a que aumentan el volumen de suelo que la planta puede explorar y por consiguiente aumentan también la eficiencia en la toma de fosfatos (Jeffries et al., 2003; Smith y Read, 2010).

Los beneficios que otorgan a la planta por sí solos cada uno de estos grupos de microorganismos, podrían potenciarse mediante la coinoculación (Dobbelaere et al., 2003). Las relaciones de sinergia que se dan naturalmente entre ellos en la rizosfera, constituyen una característica que puede aprovecharse para mejorar la eficiencia de un biofertilizante.

La biofertilización con PGPR estimula la relación entre la planta y los hongos AM (Vessey, 2003). Del mismo modo, Kaschuk et al. (2009) encontraron que la coinoculación de rizobios y hongos AM estimuló la fotosíntesis y el rendimiento en leguminosas. En alfalfa arbórea nodulada se observó un efecto positivo en el crecimiento solamente cuando se inoculó una PGPR con un hongo AM (Valdenegro et al., 2001), la inoculación con *Glomus* sp. de plantas de *P. vulgaris* noduladas con *Rhizobium leguminosearum* mejoró la nodulación, crecimiento y fijación de nitrógeno (Mortimer et al., 2008). Efectos similares sobre el crecimiento y nodulación se observaron en trébol subterráneo coinoculado con un hongo AM y la PGPR *Pseudomonas putida* (Meyer y Linderman, 1986), al igual que en plantas de soja coinoculadas con *Glomus clarum* y *Bradyrhizobium japonicum* (Antunes et al., 2006).

Asimismo se observó un aumento de varios parámetros de crecimiento y contenido de clorofila al coinocularse *Methylobacterium oryzae* y varios hongos AM en pimiento (Kim et al., 2010).

Al igual que la coinoculación de hongos micorrícicos con rizobios y bacterias PGPR favorece el crecimiento, existen estudios que describen este efecto en la coinoculación de PGPR y rizobios. *Azospirillum* spp. aumentó la nodulación y el crecimiento de leguminosas cuando se inoculó con *Rhizobium* sp. (Remans et al., 2008). Se observó promoción de crecimiento de guisantes coinoculados con *R. leguminosearum* y *Pseudomonas* (Kumar et al., 2001) y aumento de la nodulación en alubia cuando se inoculó una cepa de *Bacillus* sp. con *R. tropici* (Camacho et al., 2001).

La identificación, calidad, producción y selección adecuada del inóculo son características críticas para la obtención de un buen resultado en la aplicación de un biofertilizante (Vessey, 2003; Barea et al., 2005;).

Una vez escogidos e identificados los microorganismos con posibles cualidades promotoras de crecimiento evaluadas *in vitro*, la realización de ensayos en planta es crucial para determinar la acción promotora de crecimiento. Inicialmente se deben realizar experimentos en condiciones estériles o altamente controladas con sustratos inertes para determinar la acción directa del microorganismo sobre la planta. Posteriormente estos ensayos deben realizarse en un sistema natural, ya sea en invernadero o en campo (Barriuso et al., 2008).

El éxito de un biofertilizante se encuentra directamente relacionado con la supervivencia de los microorganismos (PGPR, rizobios u hongos micorrícicos) introducidos en el agroecosistema y la subsecuente colonización de la rizosfera y de las raíces de los cultivos. Una vez introducidos en el suelo, el tamaño de la población de microorganismos puede verse reducido por factores abióticos y bióticos como condiciones climáticas, tipo de suelo, prácticas agrícolas, tipo de planta y particularmente por la comunidad de microorganismos residentes en la rizosfera (Van Veen et al., 1997; Castro-Sowinski et al., 2007). Por lo tanto la competitividad de los microorganismos de un inoculante en un determinado suelo o cultivo es primordial para su sobrevivencia y para el éxito del inoculante.

La comercialización extensiva de biofertilizantes es un nicho que aún falta por explotar. El uso extensivo de estos productos biotecnológicos ha tomado fuerza en los últimos años, especialmente en países en donde el uso de agroquímicos es poco rentable en la agricultura. Sin embargo, la falta de respuestas consistentes en diferentes cultivos y lugares, y la falta de conocimiento sobre el crecimiento, almacenamiento, transporte, formulación y aplicación de los microorganismos ha hecho que su uso comercial sea aún escaso (Vessey, 2003; Glick, 2012).

## 2 OBJETIVOS

En el siguiente trabajo se probaron combinaciones de diferentes microorganismos en condiciones gnotobióticas, en invernadero (microcosmos) y en campo con el objetivo de evaluar su capacidad como promotores de crecimiento en pimiento (*C. annuum*) y alubia (*P. vulgaris*) para su posterior utilización en el desarrollo de biofertilizantes.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Muestreo y aislamiento de bacterias endofíticas y hongos formadores de micorrizas arbusculares (hongos AM)

Se utilizaron las bacterias endofíticas aisladas de raíces según se describe en el capítulo anterior.

El aislamiento de hongos formadores de micorrizas arbusculares se realizó a partir de los mismos suelos muestreados para el aislamiento de bacterias endofíticas. En cada suelo se tomaron tres plantas con su respectivo suelo (20 cm de profundidad). Posteriormente se mezclaron las tres muestras de suelo. Una vez homogenizado, una parte del suelo se destinó a la determinación del número más probable (NMP) y el resto se repartió en dos macetas. En una de las macetas se mantuvo la planta de alubia o pimiento procedente de campo hasta completar su ciclo y en la otra se trasplantaron cuatro plántulas de puerro, de semilleros previamente preparados (de tres semanas), que se utilizaron como planta trampa. Los semilleros se prepararon mezclando semillas de puerro esterilizadas (hipoclorito de sodio al 10% 30 minutos y tres lavados con agua destilada estéril) con arena esterilizada en autoclave.

Una vez que las plantas de alubia y pimiento terminaron su ciclo en la maceta (aproximadamente dos meses después), se cortó la parte aérea y se colocaron en su lugar plántulas de puerro; los puerros trasplantados inicialmente en las macetas con suelo se trasplantaron nuevamente a macetas con arena esterilizada en autoclave, con el objetivo de obtener posteriormente inóculo más limpio proveniente de esta planta trampa. Las plantas de puerro se mantuvieron creciendo durante cinco meses más y después de este periodo se procedió a realizar el aislamiento de esporas de hongos AM. Las esporas de hongos AM, presentes en el suelo y arena se recuperaron mediante tamizado húmedo y decantado (Gerdemann y Nicolson, 1963). Se tomaron aproximadamente 100 ml de suelo o arena, se pusieron en un vaso de precipitado, se añadieron 2 l de agua del grifo y se mezcló manualmente, procurando disgregar las partículas de tierra o grumos grandes. Una vez mezclado se decantó inmediatamente el líquido a través

de una columna de tamices con los siguientes tamaños de luz: 500  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , y 125  $\mu\text{m}$ . El material retenido en los tamices de 250  $\mu\text{m}$  y 125  $\mu\text{m}$  se transfirió a placas de Petri y con ayuda de un estereomicroscopio, agujas, pinceles y pipetas pasteur se recuperaron esporocarpos y esporas de hongos AM y se clasificaron por sus características morfológicas.

### **3.1.1 Aislamiento y producción de esporas de hongos AM**

Las esporas morfológicamente similares (morfotipo) y pertenecientes a un mismo suelo se agruparon y se inocularon en plántulas de puerro. Se separaron 20 esporas de cada tipo, se pusieron en una gota de agua estéril, se tomaron con una pipeta pasteur y se dejaron caer directamente sobre la raíz de la plántula. Las plántulas se sembraron en alvéolos de 4,5 x 3 cm con arena esterilizada en autoclave y por cada tipo de spora se sembraron dos puerros. Las plántulas se mantuvieron en los alvéolos por dos meses y luego se pasaron a macetas de 4000  $\text{cm}^3$  durante aproximadamente nueve meses para la producción de esporas y obtención de inóculo. Cumplido este periodo de tiempo se cortó el suministro de agua para eliminar la humedad de la arena y se cortó la parte aérea de la planta. La raíz se cortó en trozos y se incorporó a la arena; se verificó la presencia y pureza del inóculo al estereomicroscopio, tanto en raíces como en el sustrato. El inóculo se guardó en bolsas a 4 °C.

Las plántulas y plantas de pimiento, alubia y puerro se mantuvieron en fitotrones con 16 horas de luz a 24 °C, ocho horas de oscuridad a 18 °C y humedad relativa del 65%.

### **3.1.2 Identificación de hongos AM**

Se tomaron muestras de los morfotipos de esporas producidas en plantas de puerro sembradas en arena estéril nueve meses después de su inoculación. Cada muestra se identificó morfológica y molecularmente.

#### ***3.1.2.1 Identificación morfológica***

La identificación morfológica se realizó con ayuda de sitios web (Schüßlery Walker, 2010) y de personal técnico cualificado de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ), centro de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Las muestras mantenidas en arena estéril se tamizaron y de cada muestra se aislaron esporas que se fotografiaron con una cámara digital en un microscopio. Las muestras se fijaron en una mezcla de los reactivos PVLG y Melzerreagent (Koske y Tessier, 1983).

### **3.1.2.2 Identificación molecular**

La identificación molecular se efectuó mediante una PCR anidada; la primera con los cebadores universales para eucariotas del 18S RNA ribosomal: NS1 (5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3') y NS4 (5' CTTCCGTCAATTCCTTTAAG 3') y la segunda con los cebadores específicos AML1 (5' ATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGA 3') y AML2 (5' GAACCCAAACACTTTGGTTTCC 3'), que amplifican la subunidad pequeña (18S) del RNA ribosomal de todos los subgrupos de hongos AM (Glomeromycota) y que excluyen secuencias de otros organismos (Lee et al., 2008).

Para la primera PCR se tomó una espora de cada grupo (morfortipo) y se introdujo en microtubos para PCR con 23  $\mu$ l de agua miliQ; rompiendo la espora con la punta de la pipeta. La PCR se realizó con el kit ilustra TMpu ReTaqready-To-Go PCR vedas (Amersham Biosciences Europe GmbH, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante con un volumen total de 25  $\mu$ l, una concentración de 0,2  $\mu$ M para cada cebador y una esfera del kit para cada reacción. La PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 94 °C tres minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C 30 segundos; anillamiento a 40 °C un minuto y extensión a 72 °C un minuto) y extensión final a 72 °C 10 minutos.

El producto de esta PCR se utilizó en la segunda. Se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, EE.UU). En 25  $\mu$ l de volumen total se añadió 1  $\mu$ l del producto universal de la primera PCR y 9,5  $\mu$ l de agua miliQ y se obtuvo una concentración final de cada primer (AML1 y AML2) de 0,2  $\mu$ M y del Green Master Mix de 1X. La PCR se desarrolló en estas condiciones de reacción: predesnaturalización a 94 °C tres minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C un minuto, anillamiento a 62 °C un minuto y extensión a 72 °C un minuto) y extensión final a 72 °C 10 minutos. Los 25  $\mu$ l del producto de la PCR se cargaron y corrieron en un gel de agarosa al 1,2%, sin añadir tampón de carga ya que el mix utilizado contenía colorante, se tiñó con GelRed™ y se observó con luz UV. Se obtuvo una única banda de 800 pb, se cortó y purificó con el kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN) y se envió a secuenciar. La secuencia se comparó con bases de datos mediante un blastn.

### 3.1.3 Determinación del número más probable (NMP)

La determinación del NMP se realizó con el objetivo de estimar el número de propágulos infectivos de hongos AM por centímetro cúbico de suelo. Esta metodología (Kormaniky McGraw, 1982) consistió en hacer diluciones de suelo con arena esterilizada en autoclave, colocar plántulas de puerro en estas diluciones y evaluar posteriormente su micorrización.

La muestra de suelo proveniente de cada localidad y homogenizada como se describió anteriormente se disolvió con arena esterilizada en autoclave. Se efectuaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y suelo sin diluir; cada dilución constó de seis repeticiones. La dilución inicial se realizó mezclando 100 ml de suelo y 900 ml de arena esterilizada en autoclave, a partir de esta dilución se hicieron el resto de diluciones repitiendo el mismo procedimiento. El suelo se repartió en alveolos de 5,5 x 6,5 cm, se plantó en cada alveolo un puerro proveniente de semilleros y se mantuvieron en cámara de crecimiento en las siguientes condiciones: 16 horas de luz a 24°C, ocho horas de oscuridad a 18°C y humedad relativa del 65%. A las seis semanas de crecimiento se tiñeron las raíces y se determinó al microscopio la presencia o ausencia de infección micorrízica, para lo cual se evaluó la raíz completa. El NMP de propágulos formadores de micorrizas se calculó mediante la tabla VIII<sub>2</sub> de (Fisher y Yates, 1949). Para determinar el valor de la tabla, se evalúan al azar cinco de las seis repeticiones efectuadas para cada dilución en cada suelo. Se sumaron las plantas micorrizadas en total para cada suelo (suma de todas las diluciones) y la sumatoria se dividió entre cinco; el número resultante de esta división corresponde a un valor  $\lambda$  que representa el número de propágulos infectivos de hongos AM por centímetro cúbico de suelo.

### 3.1.4 Tinción de raíces

Se utilizó la metodología descrita por Koske y Gemma (1989). Las raíces se lavaron con agua para retirar partículas de suelo o sustrato. Se transfirieron a tubos de ensayo y se cubrieron con KOH al 10%. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas o a 60 °C durante una hora en estufa. Seguidamente se eliminó la solución de KOH y las raíces se volvieron a lavar con agua. Luego, se cubrieron con HCl al 1% durante cinco minutos, se desechó el HCl e inmediatamente y sin aclarar se añadió una solución 0,05% azul tripán en ácido láctico al 99,5% hasta cubrir las raíces con el propósito de teñirlas. Se mantuvieron durante 24 horas (o 60 °C una hora) en esta solución, al finalizar este tiempo se eliminó la solución y finalmente se añadió otra solución conservante de glicerol ácido (500 ml glicerol, 450 ml agua, 50 ml 1% HCl) en la que las raíces teñidas permanecieron

indefinidamente. Las raíces teñidas se observaron directamente al estereomicroscopio.

### **3.2 Inoculación de bacterias endofíticas promotoras de crecimiento (PGPR) en plantas de alubia y pimiento en condiciones gnotobióticas**

Las bacterias endofíticas se escogieron según la evaluación *in vitro* de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal (capacidad de solubilización de fosfatos inorgánicos, de producción de sideróforos, de síntesis de auxinas (IAA) y de actividad ACC desaminasa), descrita en el artículo anterior. Además, tomando en cuenta criterios de bioseguridad, se consideró que las bacterias no representarían peligro para humanos y que no fueran fitopatógenas.

Los ensayos se establecieron en cámaras de crecimiento con fotoperiodo y temperatura regulados: 16 horas de luz a 24 °C, ocho horas de oscuridad a 18 °C y humedad relativa del 65%. El sustrato utilizado fue vermiculita exfoliada (Verlite, España) empapada previamente en agua destilada y esterilizada en autoclave en bolsas de polipropileno (Sterilin, Reino Unido) durante 50 minutos a 121 °C. Los riegos se hicieron con agua destilada esterilizada en autoclave durante 50 minutos a 121 °C y con la solución nutritiva (Rigaud y Puppo, 1975) (Tabla 3.1).

Los cultivos puros de las bacterias endofíticas utilizados en la preparación de las soluciones salinas bacterianas, provenían de placas con medio de cultivo triptic soy agar (TSA), incubadas a 28 °C durante tres días. En todos los ensayos, se incluyó un control negativo que contenía solución salina al 0,9%. El secado de partes aéreas y raíces se realizó en estufa a 70 °C durante 72 horas. Antes del secado en estufa las raíces previamente lavadas se secaron sobre papel periódico al aire libre durante 24 horas.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza, luego de comprobar la significancia de la varianza se procedió a realizar pruebas de comparaciones múltiples de medias (Tukey). Este análisis estadístico se hizo utilizando el programa SPSS versión 19.

Tabla 3.1. Solución nutritiva Rigaud y Puppo

Reactivo	Cantidad
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,200 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,200 g
KCl	0,200 g
EDTA $\text{FeNa}_2$	0,025 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,004 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,018 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,020 g
$\text{ZnSO}_4$	0,003 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
Agua destilada	1 l

### 3.2.1 Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de alubia

Se inocularon plantas de alubia variedad Riñón. Se probaron las 13 bacterias (Tabla 3.2) que presentaron mejores resultados en las pruebas *in vitro*.

Las semillas de alubia se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% durante un minuto, siete minutos con hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 5% y finalmente se hicieron tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron directamente en macetas de  $1000 \text{ cm}^3$  con vermiculita lavada estéril, dos semillas por maceta. Para cada tratamiento (cada bacteria) se sembraron 32 semillas y posteriormente se añadió un volumen de 250 ml de agua destilada estéril en los reservorios, para el mantenimiento de la humedad en el sustrato. Transcurridos 10 días se retiraron las plantas muertas o que presentaban menor crecimiento, dejando 16 plantas con crecimiento homogéneo por tratamiento, una planta por maceta. Cada planta se inoculó con  $250 \mu\text{l}$  de la solución bacteriana correspondiente en solución salina al 0,9% ( $6 \times 10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$ ). Las plantas se mantuvieron durante 38 días en cámara de crecimiento, se regaron semanalmente con 250 ml de agua destilada estéril y cada 15 días el riego se hizo con la solución nutritiva Rigaud y Puppo con 0,4 g/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Se cosechó y se obtuvo el peso seco y peso fresco de la parte aérea de la planta, además del peso seco de la raíz. Finalmente se midió la parte aérea de cada planta.

Tabla 3.2. Bacterias endofíticas inoculadas en plantas de alubia, según características *in vitro*.

Tratamiento: Cepa inoculada	Identificación según 16s
BSC 1-2	<i>Achromobacter spiritinus</i>
RVSV 1-5	<i>P. thivervalensis</i>
RVPB 1-1	<i>P. hibiscicola</i>
SCB 3-1	<i>P. baetica</i> *
VCV 3-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>
RVSV 1-3	<i>P. thivervalensis</i>
SRN 3-2	<i>Bacillus oleronius</i>
VCC 3-3	<i>P. thivervalensis</i>
RVPB 1-2	<i>Enterobacter ludwigii</i>
RVPB 2-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>
RVPB 2-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
PPSB 2-2	<i>E. ludwigii</i>
FVA 1-4	<i>R. massiliae</i> *

\*Eliminadas de la colección debido a la contaminación de la cepa

### 3.2.2 Coinoculación del rizobio *R. leguminosarum* PGPR en plantas de alubia

El procedimiento utilizado fue el mismo descrito en el punto anterior. Se utilizaron las mismas cepas bacterianas, pero cada planta se inoculó, además de la bacteria endofítica, con 250 µl de una suspensión en solución salina de  $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> de una cepa de *R. leguminosarum*, seleccionada por su efectividad en la fijación de nitrógeno en alubia (Mulas et al., 2011). La cepa de rizobio provenía de cultivo puro en medio yeast malt extract (Tabla 3.3), de cinco días a 28 °C. El riego se realizó con solución nutritiva Rigaud y Puppo libre de nitrógeno. Hubo tres controles, uno sin inocular, al que se añadieron 250 µl de solución salina estéril y otro inoculado únicamente con la cepa de rizobio antes indicada. El tercer control también sin inocular, estuvo regado con la solución Rigaud y Puppo con 0,4 g/l de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Al cabo de 38 días tras la siembra, se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, número y peso seco de los nódulos.

Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo YMA.

Reactivo	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1l

### 3.2.3 Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de pimiento

Se evaluaron 16 bacterias (Tabla 3.4) en plantas de pimiento morrón ecotipo “de Fresno”. Las semillas se sembraron en medio agar agua (AA: 20 g l<sup>-1</sup> de agar en agua destilada), previamente desinfectadas con etanol al 70% un minuto, hipoclorito de sodio al 2% cinco minutos y tres lavados con agua destilada estéril.

Al cuarto día de la siembra en AA, se trasplantaron las semillas a alveolos (28 x 28 x 45 mm) con vermiculita lavada estéril (28 semillas por tratamiento) y una semana después se inocularon con las bacterias en solución salina al 0,9 %. Cada planta se inoculó con 250 µl de cada bacteria a una concentración de 6x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. A las dos semanas se realizó otro trasplante a macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> con vermiculita lavada estéril (las mejores 16 plantas) y las plantas se inocularon nuevamente con las capas bacterianas. Se regaron semanalmente con 250 ml de agua destilada estéril y cada 15 días el riego se hizo con la solución nutritiva Rigaud y Puppo con 0,4 g/l de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Se cosechó tres meses después de la siembra de las semillas en AA. Se obtuvo el peso seco y peso fresco de la parte aérea de la planta, peso seco de la raíz y se midió la parte aérea de cada planta.

Tabla 3.4. Bacterias endofíticas inoculadas en plantas de pimiento, según características *in vitro*.

Tratamiento: Cepa inoculada	Identificación según 16s
RVPB 2-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
SRN 3-2	<i>B. oleronius</i>
SCFB 3-1	<i>B. siamensis</i>
FVA 1-4	<i>R. massiliae</i> *
VCC 3-3	<i>P. thivervalensis</i>
SCFB 1-1	<i>B. mycooides</i>

Tabla 3.4. Bacterias endofíticas inoculadas en plantas de pimiento, según características *in vitro* (Continuación).

Tratamiento: Cepa inoculada	Identificación según 16s
RVPB 1-2	<i>E. ludwigii</i>
RVSV 1-5	<i>P. thivervalensis</i>
SCB 3-1	<i>P. baetica*</i>
RVSV 1-3	<i>P. thivervalensis</i>
RVPB 1-1	<i>P. hibiscicola</i>
VCV 3-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neoaurantiaca</i>
FCB 2	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>
RVPB 2-1	<i>S. maltophilia</i>
PPSB 2-2	<i>E. ludwigii</i>
BSC 1-2	<i>A. spiritinus</i>

\*Eliminadas de la colección debido a la contaminación de la cepa

### 3.3 Inoculación de combinaciones binarias de microorganismos para detectar compatibilidad, con la finalidad de estimular el crecimiento vegetal en microcosmos

El objetivo de este ensayo fue analizar en plantas de alubia y pimiento en invernadero, la compatibilidad de ocho combinaciones binarias de varios microorganismos rizosféricos, que se estimó mediante el efecto promotor del crecimiento vegetal de dichas combinaciones. Se utilizaron dos inóculos de hongos AM autóctonos, A y F, aislados y reproducidos en el laboratorio, los rizobios LET1910 y LCS0306, parte de la colección del grupo de investigación (Mulas et al., 2011) y las cepas bacterianas endofíticas que mostraron mejores resultados en los ensayos en condiciones axénicas.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero en macetas de 4.000 cm<sup>3</sup>. Como sustrato se utilizó una mezcla en proporción 4:1 (v:v), de suelo con vermiculita exfoliada (Verlite, España). El suelo se extrajo de fincas productoras de alubia de Sueros de Cepeda, para los ensayos con alubia y de fincas productoras de pimiento Morrón de Fresno de la Vega, para los ensayos con pimiento. Ambas fincas pertenecientes a la IGP “Alubia de la Bañeza-León” y “Pimiento de Fresno-Benavente”, ubicadas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, España.

El diseño experimental consistió en Bloques Completos al Azar con tres bloques y ocho tratamientos más dos controles por bloque. Cada unidad experimental estuvo constituida por cuatro macetas con una planta por maceta.

Las plantas se regaron según requerimientos hídricos para mantener el suelo a capacidad de campo. Se realizaron análisis de nutrientes de ambos suelos. Las plantas se abonaron con N, P, K. El cálculo del abonado con P y K se realizó teniendo en cuenta la riqueza del suelo en estos dos macronutrientes y el procedimiento de cálculo propuesto por Urbano-Terrón (2002). En cuanto a la fertilización con nitrógeno, se aportaron las extracciones esperadas de nitrógeno según Urbano-Terrón (2002) hasta el momento de la floración.

Las condiciones de crecimiento de las plantas en cámara de crecimiento fueron las mismas descritas en la sección anterior.

Los cultivos puros de las bacterias endofíticas utilizados en la preparación de las soluciones salinas bacterianas, provenían de placas con medio de cultivo triptic soy agar (TSA), incubadas a 28 °C durante tres días. Los rizobios utilizados (LET1910 y LCS0306) en las inoculaciones provenían de placas con medio de cultivo YMA de cinco días a 28 °C.

El secado de partes aéreas se realizó en estufa a 70 °C durante 72 horas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA con el paquete estadístico SPSS.

### 3.3.1 Inoculaciones en plantas de alubia

Se inocularon las bacterias endofíticas RVPB 2-1 (*S. maltophilia*) y RVPB 2-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca*). Se probaron junto con los dos inóculos de hongos micorrícicos (A y F) y el rizobio LCS0306. Los tratamientos se describen en la tabla 3.5.

La desinfección de las semillas de alubia se realizó de la misma forma que en ensayos anteriores. Para obtener uniformidad de plantas, se hizo un semillero en vermiculita y 10 días después las plántulas se trasplantaron a macetas y se transfirieron a invernadero. En el momento del trasplante a la maceta, cada planta se inoculó con 4 ml de una suspensión de bacterias en solución salina (0,9% NaCl) a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. En los tratamientos compuestos por bacteria y rizobio se inocularon 2 ml con cada cepa. La inoculación de las bacterias se hizo directamente sobre la raíz. Para la inoculación de los hongos micorrícicos en los tratamientos en los que correspondió, se pusieron 10 g de arena conteniendo el inóculo micorrícico antes del trasplante.

Se utilizaron dos controles sin inocular, uno fertilizado con el 100% de las extracciones esperadas de N para todo el ciclo de cultivo según Urbano-Terrón, (2002) y el otro con  $\frac{1}{4}$  de dicha cantidad. Los controles se inocularon con solución salina. Todos los tratamientos y uno de los controles, se fertilizaron con  $\frac{1}{4}$  de las extracciones esperadas de nitrógeno para todo el ciclo de cultivo según Urbano-Terrón (2002), mientras que el control con el 100% del nitrógeno se fertilizó con el total del nitrógeno.

El período de cultivo fue de 12 semanas, hasta la formación de vainas y llenado de semillas. Se cosechó y se evaluaron el rendimiento y sus componentes, además el índice de cosecha. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza con el software SPSS.

### 3.3.2 Inoculaciones en plantas de pimiento

Las bacterias endofíticas escogidas fueron BSC 1-2 (*A. spiritinus*) y PPSB 2-2 (*E. ludwigii*), los dos inóculos de hongos micorrícicos (A y F) y el rizobio LET1910. Los tratamientos se describen en la tabla 2.5.

La desinfección y siembra de las semillas de pimiento se realizó como en ensayos anteriores. Al cuarto día de la siembra las semillas germinadas se pasaron a alveolos (28 x 28 x 45 mm) con vermiculita y una semana después se inocularon con las bacterias. Cada planta se inoculó con 2 ml de una suspensión de la bacteria correspondiente en solución salina (0,9% NaCl) a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Los tratamientos compuestos por una bacteria y un rizobio se inocularon con 1 ml de cada uno. Dos semanas después de la primera inoculación, las plantas se trasladaron a macetas en invernadero. En el momento del trasplante, se inocularon de nuevo con las bacterias. Se pusieron 5 ml de la suspensión bacteriana ( $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) en los tratamientos que llevaban una sola bacteria, y en los compuestos por bacteria endofítica y rizobio se inocularon con 2,5 ml de cada uno. También en el momento del trasplante, se inocularon con hongos micorrícicos los tratamientos que los llevaban, inoculados de igual que forma que en alubia. Las inoculaciones bacterianas se hicieron directamente sobre la raíz. Los controles fueron los mismos que los descritos para alubia. Asimismo, para la fertilización y el riego se siguieron los mismos criterios que en la alubia.

En este caso las plantas se mantuvieron durante siete semanas en el invernadero hasta la floración. En el momento de la cosecha se tomó el peso fresco y seco de la parte aérea. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza con el software SPSS.

Tabla 3.5. Tratamientos de los ensayos de microcosmos en alubia y pimiento en invernadero.

Tratamientos	
Alubia	Pimiento
RVPB 2-1* + A**	BSC 1-2* + A
RVPB 2-1 + F**	BSC 1-2 + F
RVPB 2-2* + A	PPSB 2-2* + A
RVPB 2-2 + F	PPSB 2-2 + F
LCS0306*** + RVPB 2-1	LET1910*** + BSC 1-2
LCS0306 + RVPB 2-2	LET1910 + PPSB 2-2
LCS0306 + A	LET1910 + A
LCS0306 + F	LET1910 + F
Control Positivo	Control Positivo
Control Negativo	Control Negativo

\*Bacterias endofíticas

\*\* Hongos AM

\*\*\* Rizobio

### 3.4 Inoculación en campo de microorganismos promotores de crecimiento en plantas de alubia variedad Riñón y pimiento morrón ecotipo “de Fresno”

El objetivo de este ensayo fue seleccionar en campo el biofertilizante más adecuado para el cultivo de la alubia y pimiento. Las parcelas se ubicaron en los terrenos de la Escuela Superior Técnica de Ingeniería Agraria (ESTIA) de la Universidad de León, término municipal de León, España, durante el año 2012. El diseño experimental para cada cultivo consistió en Bloques Completos al Azar, tres bloques y tres tratamientos más dos controles por bloque.

#### 3.4.1 Tratamiento del suelo antes de la siembra

En el otoño se realizó un pase de arado de vertedera en los suelos, a principios de febrero se llevó a cabo un gradeo con grada de discos.

##### *a) Condiciones climatológicas*

En la figura 3.1 se observan las temperaturas y precipitaciones medias (de 1971 a 2000) y del año 2012 registradas en el observatorio de León (La Virgen del Camino). Con respecto al historial registrado, 2012 fue un año caracterizado por las bajas precipitaciones y temperaturas ligeramente superiores a la media, especialmente durante el periodo comprendido entre los meses de mayo y septiembre.

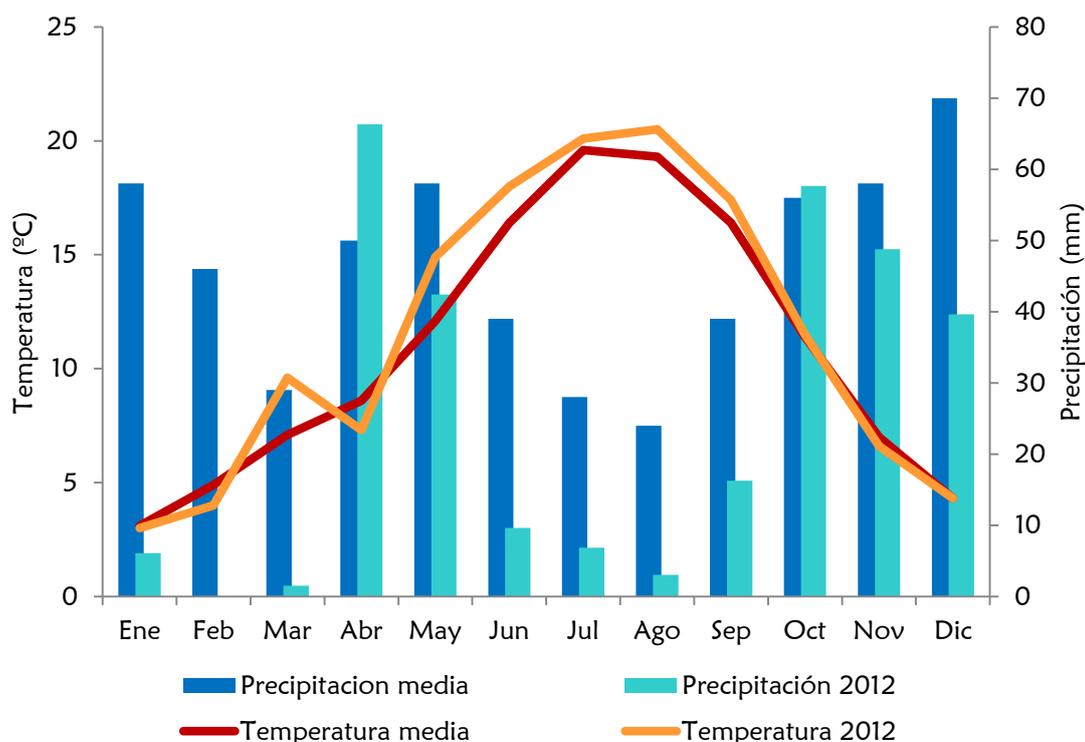


Figura 3.1. Temperaturas y precipitaciones medias (de 1971 a 2000) y del año 2012 registradas en el observatorio de León (La Virgen del Camino).

### *b) Sistema de Riego*

El sistema de riego empleado en el ensayo fue riego por goteo, con el objetivo de mantener el suelo a capacidad de campo en todo momento.

### *c) Control de plantas adventicias*

La eliminación de plantas adventicias se realizó mediante un herbicida total (glifosato 36% RoundUp, Monsanto, EE.UU.) entre subparcelas y en los pasillos, mientras que se realizaron cuatro escardas manuales a lo largo del cultivo.

## 3.4.2 Ensayo en alubia

### *a) Dimensiones de la parcela*

Cada unidad experimental o parcela elemental, de dimensiones 2 m por 1,5 m, contenía cuatro filas de plantas separadas 0,5 m y dentro de cada fila había 10 plantas distanciadas 0,15 m. El total de plantas por parcela elemental fue de 40,

pero las plantas externas se consideraron borde, por lo que se muestrearon las 16 plantas centrales. Las parcelas elementales se separaron entre sí 2,25 m de las contiguas en cada una de las dos direcciones posibles.

### *b) Tratamientos*

Los tratamientos fueron los siguientes:

**LCS0306.** Inoculación con el rizobio *R. leguminosearum*, LCS0306, parte de la colección del grupo (Mulas et al., 2011). Sin fertilización nitrogenada.

**LCS0306 + RVPB 2-2.** Combinación binaria entre el rizobio antes descrito (LCS0306) y la bacteria endofítica (PGPR) RVPB 2-2, *P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca*. Sin fertilización nitrogenada.

**F + LCS0306 + RVPB 2-2.** Combinación terciaria de microorganismos: el rizobio (LCS0306), la bacteria endofítica (RVPB 2-2) y el hongo AM, *G. mosseae* (F), inóculo preparado en el laboratorio proveniente de suelos de fincas productoras de alubia. Sin fertilización nitrogenada.

**Control con nitrógeno:** Control no inoculado fertilizado con nitrógeno en forma de nitrato amónico cálcico (NAC, con riqueza del 27%), con el 100% de las extracciones esperadas de nitrógeno para todo el ciclo de cultivo según Urbano-Terrón, (2002).

**Control sin nitrógeno.** Control no inoculado y sin fertilización nitrogenada

### *c) Siembra e inoculación*

La siembra en campo se realizó el 18 de junio de 2012. Las semillas se pregerminaron en vermiculita 10 días antes de la siembra en campo, para garantizar homogeneidad. Las semillas se desinfectaron según la metodología empleada en los ensayos anteriores y se sembraron en bandejas con turba como sustrato. Para la siembra de cada semilla en campo se abrió un hueco de 4 cm de profundidad. En el fondo del hueco, en el tratamiento que incluía el hongo AM se agregaron en primer lugar 10 g del inóculo. En todos los tratamientos se agregaron en el hueco 5 ml de vermiculita exfoliada y estéril que se inoculó con 1 ml de la suspensión de la PGPR o 500  $\mu$ l de la suspensión de la PGPR y 500  $\mu$ l del rizobio en los tratamientos que llevaban ambos microorganismos. El inóculo de la PGPR se preparó suspendiendo el crecimiento bacteriano de tres días precedente de TSA en solución salina, 0,9% NaCl. El rizobio provenía de cultivos puros de siete días

en medio YMA y también se resuspendió en solución salina al 0,9%. En ambos casos la concentración del inóculo fue de  $1,2 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>. Finalmente se colocó la semilla pregerminada y se tapó con suelo.

#### *d) Fertilización*

Justo después del trasplante se procedió al abonado con P y K utilizando superfosfato simple de cal (16% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y cloruro potásico (37% K<sub>2</sub>O). El cálculo de las cantidades se realizó teniendo en cuenta la riqueza del suelo en estos dos macronutrientes (Anexo, Tabla A3) y el procedimiento de cálculo propuesto por Urbano-Terrón (2002). El control con N se fertilizó con las extracciones esperadas de nitrógeno para todo el ciclo de cultivo según Urbano-Terrón (2002), dividiendo la cantidad total en dos aportaciones, una justo después del trasplante, y la segunda en el momento de la floración. Se agregaron 3,8 g por parcela (tratamiento) en total, divididos en 1,9 g por fase para el tratamiento Control con nitrógeno.

#### *e) Cosecha*

La cosecha se realizó el 20 de septiembre de 2012. Se arrancó la parte aérea de la planta junto con las vainas, procurando que la mayoría de las vainas fueran de color amarillo. Se mantuvieron 10 días secando al aire libre y se tomaron datos del rendimiento, sus componentes y del índice de cosecha.

La cosecha se realizó cuando las vainas estuvieron secas, se cosechó la parte aérea de la planta junto con las vainas. Se mantuvieron 10 días secando al aire libre y se tomó el peso de cada planta con vainas pero sin semillas. Se obtuvo además el número de vainas y semillas por planta así como también el peso de las semillas. Se realizó una estimación del peso seco tanto de semillas como de plantas.

El grano se analizó químicamente por su contenido en P, K, Ca y Mg; este análisis se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopía de emisión atómica en un ICP-AES. También se analizó el N por la técnica Kjeldahl. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA con el software de SPSS.

### 3.4.3 Ensayo en pimiento

#### a) Dimensiones de la parcela

Cada unidad experimental o parcela elemental, de dimensiones 2,4 m por 1,5 m, contenía cuatro filas de plantas separadas 0,6 m y dentro de cada fila había 10 plantas distanciadas 0,15 m. El total de plantas por parcela elemental fue de 40, pero las plantas externas se consideraron borde, por lo que se muestrearon las 16 plantas centrales. Las parcelas elementales se separaron entre sí 2,25 m de las contiguas en cada una de las dos direcciones posibles

#### b) Tratamientos

**LET1910 + SCFB 3-1.** Combinación binaria entre el rizobio *R. leguminosearum* (LET1910), productor de IAA y sideróforos (Mulas et al., 2011) y la bacteria endofítica (PGPR) SCFB 3-1, *B. siamensis*.

**SCFB 3-1 + A.** Combinación binaria entre la bacteria endofítica (SCFB 3-1) y el hongo AM, *G. mosseae* (A), inóculo preparado en el laboratorio proveniente de suelos de fincas productoras de pimiento.

**LET1910 + SCFB 3-1 + A.** Inoculación terciaria de los microorganismos descritos: el rizobio (LET1910), la bacteria endofítica (SCFB 3-1) y el hongo AM (A).

**Control con nitrógeno:** Control no inoculado fertilizado con nitrógeno en forma de nitrato amónico cálcico (NAC, con riqueza del 27%), con el 100% de las extracciones esperadas de nitrógeno para todo el ciclo de cultivo según Urbano-Terrón (2002)

**Control con una cuarta parte de nitrógeno.** Control no inoculado y con una cuarta parte de las extracciones esperadas de nitrógeno.

#### c) Siembra e inoculación

Inicialmente se preparó un semillero de pimiento en alvéolos individuales cinco semanas antes del trasplante en campo. Las semillas de pimiento se desinfectaron como en ensayos anteriores y se sembraron en turba. La inoculación con bacterias se realizó en el propio alvéolo del semillero inmediatamente antes del trasplante, con 5 ml del inóculo, a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>, preparado según se describió para el caso de la alubia; los tratamientos que incluían una PGPR y un rizobio se inocularon con 2,5 ml de la solución de cada microorganismo. El trasplante se realizó el 30 de mayo de 2012. Al igual que en alubia, se hizo un

hueco de 4 cm de profundidad para colocar la plántula en campo y en el caso de los tratamientos que incluían el hongo AM, en el fondo de la mismo se agregaron 10 g del inóculo antes de colocar la planta.

#### *d) Fertilización*

Justo después del trasplante se procedió al abonado con P y K utilizando superfosfato simple de cal (16%  $P_2O_5$ ) y cloruro potásico (37%  $K_2O$ ). El cálculo de las cantidades se realizó teniendo en cuenta la riqueza del suelo en estos dos macronutrientes (Anexo, Tabla A3) y el procedimiento de cálculo propuesto por Urbano-Terrón (2002). El control con nitrógeno se fertilizó con las extracciones esperadas de nitrógeno para todo el ciclo de cultivo según Urbano-Terrón (2002) dividiendo la cantidad total en dos aportaciones, una justo después del trasplante, y la segunda en el momento de la floración. En el otro control y en los tratamientos solo se aplicó  $\frac{1}{4}$  de dichas extracciones de nitrógeno.

#### *e) Cosecha*

La cosecha se hizo escalonada y finalizó el 23 de octubre del 2012. Se cosecharon los pimientos que presentaban un 80% de su superficie madura, contabilizando todos los parámetros necesarios para el cálculo de los componentes del rendimiento. Al finalizar la cosecha de los frutos, se cosechó la parte aérea de la planta, para obtener el índice de cosecha. Se realizaron varios análisis químicos del fruto, por una parte del pH y del contenido de sólidos solubles totales, y por otra del contenido de P, K, Ca y Mg en el fruto (mediante la técnica de espectroscopía de emisión atómica en un ICP-AES) y de N por la técnica Kjeldahl. Se contabilizó el número de pimientos por planta y se tomó su peso fresco. Al finalizar la cosecha de los frutos, se cosechó la parte aérea de la planta y se obtuvo el peso fresco. Se realizó una estimación del peso seco de frutos y parte aérea.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Aislamiento de esporas micorrícicas, agrupación de los aislados por criterios morfológicos, producción de los propágulos y selección**

En la primera fase del proceso de aislamiento de esporas provenientes de suelo de pimiento y alubia, las esporas se clasificaron en nueve morfotipos. Se obtuvieron en total 37 aislados en los 25 suelos, pertenecientes a los nueve morfotipos mencionados (Tabla 3.6).

Estos aislados se inocularon para su multiplicación en plántulas de puerro y al cabo de 10 meses se seleccionaron los aislados que produjeron mejor crecimiento en las plantas de puerro. Asimismo se volvió a analizar la presencia y pureza del inóculo, tanto en sustrato como en raíz. La selección realizada por las plantas de puerro, fue superada por seis aislados, pertenecientes a tres morfotipos, concretamente el A (tres aislados), el B (un aislado) y el F (dos aislados) (Tabla 3.6). Los seis aislados preseleccionados se identificaron morfológica y molecularmente.

Tabla 3.6. Morfotipos de esporas de hongos micorrícicos encontrados en los suelos muestreados con cultivos de alubia y pimiento, y morfotipos seleccionados por el estado general de la planta de puerro.

Suelo	Suelos de alubia		Suelo	Suelos de pimiento	
	Morfotipos encontrados	Morfotipos seleccionados		Morfotipos encontrados	Morfotipos seleccionados
SLB	A, B, F	--	SP	No hubo aislamiento	--
SRN	B, I	--	FCA	No hubo aislamiento	--
SCB	A	A	FCB	No hubo aislamiento	--
BLQ	B, E	--	FVA	C, J	--
BMA	A, B, C, F, H	A, B	SCFA	C, J	--
BSC	C	--	SCFB	A, J	A
VCC	A, G, J	--	SCFC	J	--
VCV	A	--	SCE	No hubo aislamiento	--
PPSA	A, F	F	MTA	A, C	--
PPSB	C	--	MMM	C, J	--
PPSC	C	--	MJC	A, C	--
RVPA	C	--			
RVPB	F	F			
RVSV	No hubo aislamiento	--			

Los morfotipos marcados con --, no fueron encontrados en la etapa de selección.

#### 4.1.1 Identificación de aislados de esporas micorrícicas

Los seis aislados seleccionados fueron identificados, primero desde el punto de vista morfológico y posteriormente molecular. En todos los casos correspondió a *G. mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. Y Trappe. Esta especie perteneciente al género *Glomus*, es una de las más comunes en suelos cultivados (Andrade et al., 1998; Gianinazzi et al., 2010). Las esporas presentan tamaños entre 100 y 260  $\mu\text{m}$ . El color va desde amarillo claro hasta un amarillo dorado y son esporas globosas, aunque también pueden encontrarse algunas con formas irregulares. Se encuentran

solas, en agregados o formando esporocarpos (de dos a ocho esporas) rodeadas de peridio formado por micelio compacto (Figura 2C). Presentan una pared celular formada por tres capas: L1, L2 y L3. La L1 es la externa, hialina, mucilaginosa y está presente solamente en esporas juveniles. La L2 también hialina, se encuentra raramente en esporas maduras y es variable en su forma, según la espora y los contrastes ópticos. La L3 es la capa interna, rígida y laminada; al romperse se observan estas láminas en forma de abanico (Figura 3.2E a G). Una característica importante para la identificación de esta especie es la hifa, de color amarillo-claro en forma de embudo (Figura 3.2D).

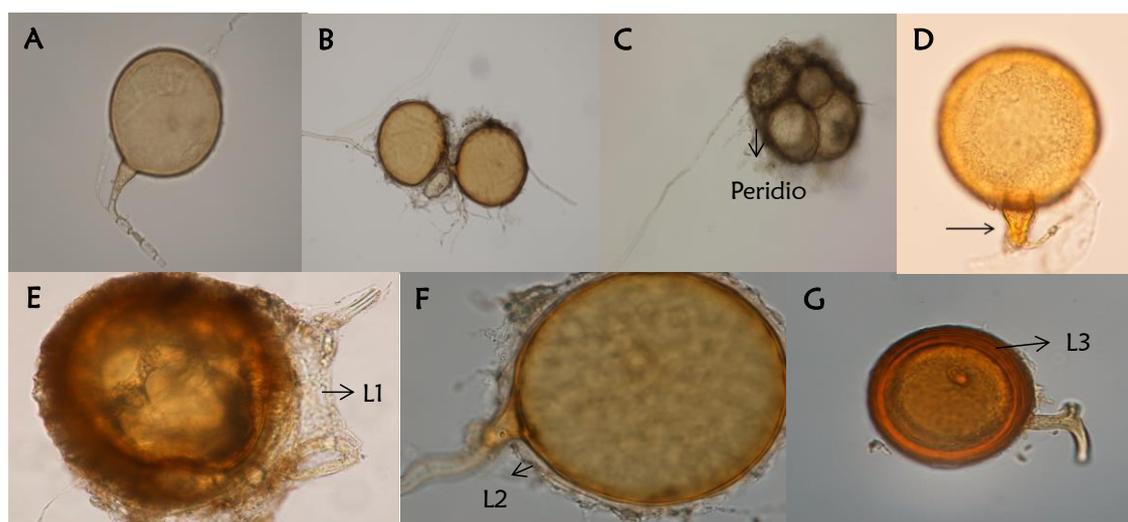


Figura 3.2. Microfotografías tomadas en los aislados de *G. mosseae*. A. Espora solitaria. B. Agregado de esporas. C. Esporocarpos con picnidio. D. Hifa en forma de embudo. E-G. Capas de la pared celular: L1 hialina desprendiéndose de la pared; L2 hialina; L3 laminada.

La identificación molecular por comparación con la base de datos blastn dio el resultado que se observa en la tabla 3.7, por lo que todos los morfotipos correspondieron a la especie *G. mosseae*.

Tabla 3.7. Identificación de los morfotipos de micorrizas aislados en suelos de Castilla y León, por comparación de la secuencia del gen 18 S rRNA con la base de datos blastn.

Código suelo	Morfotipo	Identificación	Número de accesión	Similitud (%)
SCB	A	<i>G. mosseae</i>	<a href="#">NG_017178.1</a>	99
BMA	A	<i>G. mosseae</i>	<a href="#">NG_017178.1</a>	100
BMA	B	<i>G. mosseae</i>	<a href="#">NG_017178.1</a>	100
PPSA	F	<i>G. mosseae</i>	<a href="#">NG_017178.1</a>	100
SCFB	A	<i>G. mosseae</i>	<a href="#">NG_017178.1</a>	99
RVPB	F	<i>G. mosseae</i>	<a href="#">NG_017178.1</a>	99

#### **4.2 Número más probable (NMP) de esporas de hongos micorrícicos en el suelo**

Mediante la técnica del número más probable, se realizó una estimación del número de propágulos infectivos de hongos micorrícicos en cada uno de los suelos muestreados (Figura 3.3 y Tabla 3.8). En la IGP “Alubia de La Bañeza – León”, la infectividad varió entre 1,73 y 456 propágulos por 100 ml de suelo. Al comparar estos resultados con el análisis de suelos efectuado en los suelos muestreados (Anexo, Tablas A.1 y A.2), no se encontró ninguna correlación aparente entre la infectividad de las micorrizas y el contenido de materia orgánica, ni tampoco con el estado nutricional de los suelos, en lo referente al contenido fundamentalmente de fósforo. Tampoco se encontraron diferencias por localidades. Los suelos que presentaron los valores más altos de propágulos (456/100 ml de suelo) correspondieron a diferentes zonas: Bercianos del Páramo (BLQ), Villaornate (VCC) y Pobladura de Pelayo (PPSA).

En cuanto a los suelos de la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente” (Tabla 3.8), tampoco existió correlación aparente con el contenido en materia orgánica ni con el estado nutricional, sin embargo existe un claro patrón geográfico, pues los suelos de San Cristóbal de Entreviñas, presentan los valores más elevados de propágulos, de hasta más de 500 veces superior a los de los suelos con menor contenido de propágulos, llegando hasta más de 9.000 por 100 ml de suelo. Por el contrario, en algunos suelos de las localidades de Fresno de la Vega y Micereces los valores fueron en torno a 17 por 100 ml de suelo. Aunque los hongos AM pueden encontrarse en casi todos los nichos ecológicos, se encuentran especialmente en aquellos que existe una alta diversidad de especies y en agroecosistemas manejados mediante prácticas sostenibles como aplicación de abonos orgánicos y bajas dosis de fertilizantes y productos fitosanitarios (Gianinazzi, 2002). Sin embargo, en este caso todos los agroecosistemas muestreadas incorporaban prácticas sostenibles (Anexo, Tabla A.4), por lo que no parece ser un factor determinante en el número de propágulos infectivos de hongos micorrícicos en estos los suelos, como tampoco lo es la nutrición de los suelos, según lo incida el análisis de suelos (Anexo, Tabla A.2). Las causas de este número elevado de propágulos infectivos en la localidad de San Cristóbal de Entreviñas permanecen desconocidas.

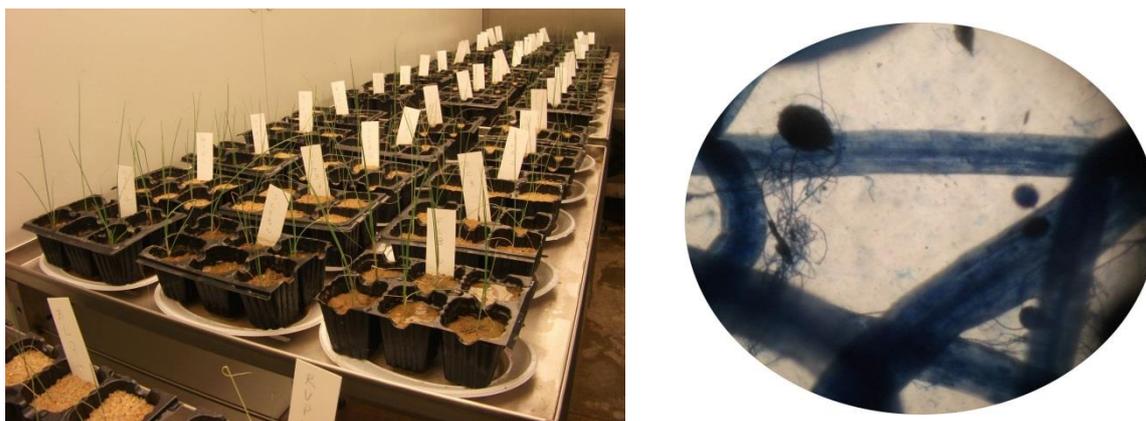


Figura 3.3. Aplicación de la técnica del número más probable (NMP) de propágulos de hongos micorrícicos en los suelos muestreados (fotografía izquierda) y observación al estereoscopio de las raíces micorrizadas (fotografía derecha).

Tabla 3.8. Resumen del número más probable (NMP) de propágulos de hongos micorrícicos en suelos muestreados de alubia y pimiento.

Suelos cultivados de alubia en la IGP "Bañeza-León"		Suelos cultivados de pimiento en la IGP "Fresno-Benavente"	
Código suelo	Propágulos por 100 ml de suelo	Código suelo	Propágulos por 100 ml de suelo
SLB	45	SP	74
SRN	17,3	FCA	Sin datos
SCB	17,3	FCB	173
BLQ	456	FVA	17,3
BMA	17,3	SCFA	1730
BCS	27	SCFB	9162
VCC	456	SCFC	1169
VCV	74	MTA	17,3
PPSA	456	MMM	173
PPSB	1,73	MJC	17,3
PPSC	2,7		
RVPA	17,3		
RVPB	27		
RVSV	27		

### 4.3 Inoculación de bacterias endofíticas (PGPR) en plantas de alubia y pimiento en condiciones gnotobióticas

#### 4.3.1 Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de alubia

La inoculación de plantas de alubia con diferentes bacterias endofíticas, produjo diferencias altamente significativas en todos los parámetros analizados: la biomasa aérea seca, biomasa seca de la raíz y biomasa aérea fresca (Tabla 3.9). La cepa RVPB2-1 (*S. maltophilia*) tuvo un claro efecto promotor del crecimiento vegetal, ya que las plantas inoculadas con ella produjeron una biomasa aérea fresca y seca significativamente más elevada que el control sin inocular. La biomasa radicular también fue un 30% mayor, aunque en este caso las diferencias con el control no fueron significativas. Esta especie contiene cepas con capacidad promotora de crecimiento (Park et al., 2005; Ryan et al., 2009). RVPB 2-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neauriantaca*) sigue a RVPB 2-1 en estimulación de producción de biomasa aérea seca, que se incrementó un 13% respecto al control, pero en este caso las diferencias no fueron significativas. El mayor desarrollo radicular se obtuvo con la cepa RVPB 1-2 (*E. ludwigii*), que casi dobló en biomasa al control sin inocular.

Por el contrario, la cepa BSC 1-2 (*A. spiritinus*) produjo un desarrollo de la parte aérea (biomasa seca) significativamente menor que el control sin inocular, y también el desarrollo radicular fue menor, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas. La inoculación con otras cuatro cepas del género *Pseudomonas*, dos de ellas de la misma subespecie que RVPB 2-2, produjeron menor desarrollo que el control sin inocular.

Los efectos beneficiosos de ciertas bacterias endofíticas de raíces, sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas ha sido demostrado en numerosas ocasiones en condiciones de laboratorio e invernadero (Hayat et al. 2010; Chaparro et al., 2012). Los géneros bacterianos a los que de manera más habitual pertenecen las bacterias promotoras del crecimiento vegetal capaces de colonizar las raíces son: *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*. (Hayat et al., 2010), y *Stenotrophomonas* (Ramos-Solano et al., 2010; Taulé et al., 2012). Nuestros resultados confirman que el efecto de promoción del crecimiento vegetal es una característica de determinados géneros y especies bacterianas presentes en el suelo, ya que todas las bacterias que han tenido efecto promotor, habían sido descritas con anterioridad como PGPR. Sin embargo resaltan de una manera clara que es muy importante el efecto de la cepa, pues dentro de la misma subespecie de *Pseudomonas*, algunas cepas tienen un efecto promotor del crecimiento vegetal, y sin embargo otras no lo manifiestan.

Tabla 3.9. Biomasa producida tras 38 días de crecimiento, por plantas de alubia inoculadas en condiciones gnotobióticas con diferentes bacterias endofíticas, frente a un control sin inocular. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamientos: Cepa inoculada	Biomasa aérea seca (g)		Biomasa de la raíz seca (g)		Biomasa aérea fresca (g)	
BSC 1-2	0,897	a	0,495	a	5,843	a
RVSV 1-5	0,961	ab	0,617	abc	6,058	ab
RVPB 1-1	1,009	ab	0,768	abcd	6,085	ab
SCB 3-1	1,133	bc	0,711	abcd	6,778	abc
VCV 3-2	1,138	bc	0,926	d	7,012	bcd
Control sin inocular	1,139	bc	0,673	abcd	6,919	abc
RVSV 1-3	1,150	bcd	0,847	bcd	7,031	bcd
SRN 3-2	1,158	bcd	0,932	d	7,113	bcd
VCC 3-3	1,254	cd	0,665	abcd	7,799	cd
RVPB 1-2	1,256	cd	1,335	e	7,856	cd
RVPB 2-2	1,290	cd	0,694	abcd	7,578	cd
RVPB 2-1	1,377	d	0,888	cd	8,087	d
PPSB 2-2 <sup>+</sup>	-		-		-	
FVA 1-4 <sup>+</sup>	-		-		-	
Media cuadrática	0,071		0,184		2,007	
F	8,624	***	13,620	***	9,353	***

<sup>+</sup>Se perdieron algunas plantas y hubo que excluirlo

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05.

Los modos de acción más estudiados en los PGPR son la solubilización de nutrientes, fundamentalmente P y Fe, la producción de auxinas y la destrucción del precursor del etileno. Por haber trabajado en condiciones axénicas e hidropónicas, de disponibilidad total de nutrientes, los efectos promotores del crecimiento vegetal observados en la planta, estarían más relacionados con la síntesis de hormonas.

En cuanto a la correlación existente entre el desarrollo de la parte aérea y radicular en el conjunto de los tratamientos, se observa que es significativa para  $p = 0,001$ ,

con un coeficiente de correlación bajo, de tan solo 0,48, pero de signo positivo, lo que rechaza la hipótesis de que una estimulación del crecimiento de la raíz, pueda ser a expensas de un menor crecimiento de la parte aérea o viceversa. Sin embargo el bajo coeficiente de correlación indica que las bacterias afectan en diferente grado a la parte aérea y radicular.

#### 4.3.2 Coinoculación de plantas de alubia con *R. leguminosarum* y bacterias endofíticas PGPR

Los resultados científicos más recientes han puesto de manifiesto las ventajas de la coinoculación de las leguminosas con rizobios y PGPR (Guiñazú et al., 2010; Fox et al., 2011; Verma et al., 2013), por lo que se realizó un ensayo de coinoculación.

Tabla 3.10. Biomasa producida tras 38 días de crecimiento, por plantas de alubia co-inoculadas en condiciones gnotobióticas, con la cepa LCS0306 de *R. leguminosarum*, y diferentes bacterias endofíticas frente a un control sin inocular y a otro control inoculado solo con el rizobio. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento: Cepa inoculada	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa de la raíz seca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa aérea fresca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa seca de nódulos (g planta <sup>-1</sup> )		Número de nódulos	
Control sin inocular y sin nitrógeno	0,565	a	0,308	a	2,491	a	0	a	0	a
SCB 3-1 + <i>R.</i> <i>leguminosarum</i>	1,035	b	0,485	ab	5,571	b	70	bcd	302	ef
Control sin inocular y con nitrógeno	1,139	bc	0,673	c	6,919	bcd	0	a	0	a
FVA 1-4 + <i>R.</i> <i>leguminosarum</i>	1,14	bc	0,583	ab	5,681	b	62	bc	214	b
VCV 3-2 + <i>R.</i> <i>leguminosarum</i>	1,742	de	0,554	ab	8,66	de	87	de	219	b

Tabla 3.10. Biomasa producida tras 38 días de crecimiento, por plantas de alubia co-inoculadas en condiciones gnotobióticas, con la cepa LCS0306 de *R. leguminosarum*, y diferentes bacterias endofíticas frente a un control sin inocular y a otro control inoculado solo con el rizobio. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). (Continuación)

Tratamiento: Cepa inoculada	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa de la raíz seca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa aérea fresca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa seca de nódulos (g planta <sup>-1</sup> )		Número de nódulos	
SRN 3-2 + <i>R. leguminosarum</i>	1,748	d	0,61	c	8,583	de	97	e	349	f
RVPB 2-2 + <i>R. leguminosarum</i>	1,868	e	0,599	c	9,513	de	89	de	251	bcde
PPSB 2-2 + <i>R. leguminosarum</i> <sup>+</sup>	-		-		-		-		-	
Media cuadrática	0,443		0,04		11,484		0,003		37795,249	
F	14,126 ***		3,171**		22,945***		39,404***		62,089***	

<sup>+</sup>Se perdieron algunas plantas y hubo que excluirlo

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

Se encontraron diferencias altamente significativas en todos los parámetros evaluados (Tabla 3.10). El experimento evidenció el efecto significativo que tienen algunas bacterias estudiadas en el incremento de la nodulación, tanto en la biomasa seca de nódulos como en el número de los mismos. Esta mejora de la nodulación tuvo como consecuencia una mayor producción de biomasa en las restantes partes de la planta (Tabla 3.10 y Figura 3.4). En concreto, las cepas RVPB 2-2 y VCV 3-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neoauriantaca*), y SRN 3-2 (*B. oleronius*) en coinoculación con rizobios, mejoraron significativamente la biomasa de nódulos y de la parte aérea, frente al tratamiento inoculado solamente con rizobios. Sin embargo, este incremento en la biomasa de nódulos, en el caso de las dos cepas de *Pseudomonas*, no va acompañado de un incremento en el número de los mismos. Por el contrario, la cepa de *B. oleronius*, incrementó de manera muy significativa tanto el número de nódulos, como la biomasa de éstos.



Figura 3.4. Comparación de plantas inoculadas con PGPR + rizobio, inoculada solo con rizobio y sin inocular.

Asimismo se encontraron bacterias que parecen tener un efecto neutro en coinoculación con rizobios, frente al control inoculado solamente con el rizobio. En algunos casos se observa (Tabla 3.10) una disminución en los valores numéricos de la biomasa aérea y radicular, pero esta disminución no es estadísticamente significativa. Atención especial merece la cepa SCB 3-1 de la especie *P. baetica*, que incrementa significativamente el número de nódulos, pero este incremento no se ve correlacionado con una mayor biomasa de los mismos, ni tampoco con mayor peso fresco y seco de la parte aérea ni de la raíz. Es importante destacar que también en el caso de la coinoculación, los efectos observados son dependientes de cepa, y no de especie.

Fox et al., (2011), encontraron que había un incremento significativo en el número de nódulos en las plantas coinoculadas con *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* y una cepa de *P. fluorescens* en comparación con las inoculadas solo con *E. medicae*. También hubo modificaciones en el tamaño y en la forma de los mismos. En nuestro caso *Bacillus* spp., produjo un aumento tanto del número como del tamaño de los nódulos. Las dos cepas que mejor efecto tuvieron en el desarrollo de la parte aérea, pertenecientes al género *Pseudomonas*, no aumentaron el número de nódulos, sino su tamaño.

Hay varios trabajos que analizan los mecanismos que regulan los procesos que suceden durante la coinoculación con rizobios y bacterias seleccionadas. En *P. vulgaris* L., Srinivasan et al., (1997) y en soja Nishijima et al., (1988), han demostrado que la coinoculación con PGPR puede mejorar la iniciación precoz del nódulo y su desarrollo. Burdman et al., (1996), atribuyeron la estimulación de la nodulación de frijol mediante la coinoculación con *Azospirillum brasilense*, a un aumento de la producción de flavonoides. Estos flavonoides son las señales químicas iniciales secretadas por la leguminosa huésped para inducir genes nod en rizobios e iniciar la simbiosis con *R. -leguminosarum* (Schultze et al. 1998). De igual manera Andrade et al., (1998), hipotetizaron que el aumento en la

nodulación en guisante como consecuencia de la coinoculación con *P. fluorescens*, se debió a un aumento de la exudación de flavonoides por la planta huésped.

Desde el punto de vista agronómico, un coinoculante puede ser interesante para el sector productivo si mejora el efecto del rizobio, pero su interés es aún mayor si mejora la nodulación en condiciones edáficas estresantes (Fox et al. 2011).

### 4.3.3 Inoculación de bacterias endofíticas en plantas de pimiento

La inoculación de plantas de pimiento con las cepas de endófitos autóctonos, produjo diferencias significativas en la biomasa seca de la parte aérea y de la raíz, pero no en la biomasa fresca de la parte aérea (Tabla 3.11). La cepa BSC 1-2 (*A. spiritinus*) causó en la planta, una producción de biomasa seca de raíz significativamente superior a la del control sin inocular. La biomasa aérea seca y fresca fueron también superiores a las del control, concretamente un 13% y 18% respectivamente, pero estas diferencias no fueron significativas. Asimismo la cepa PPSB 2-2 (*E. ludwigii*) produjo mayor desarrollo que en el control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por el contrario varias cepas produjeron menor desarrollo de biomasa que el control sin inocular, aunque de nuevo sin significación estadística. Entre las cepas que constituyeron este último grupo merece especial mención RVPB 2-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca*), que fue la que mejores resultados produjo en alubia.

Es necesario reconocer la debilidad de los resultados expuestos, pero a pesar de ello puede extraerse una conclusión clara, los efectos de la interacción entre microorganismo y planta están profundamente influenciados por la especie e incluso el cultivar de la planta huésped, tal como ya han destacado otros autores (Smith y Godman, 1999; Picard y Bosco, 2007; Remans et al., 2008). Esto queda demostrado por dos hechos observados con la experimentación: la cepa que mejor resultado proporcionó en pimiento (BSC 1-2), produjo resultados desfavorables en alubia, ya que en coinoculación con el rizobio no mejoró significativamente la producción de biomasa, y en inoculación independiente, incluso redujo significativamente la producción de biomasa con respecto al testigo sin inocular. Sorprende que dicha cepa haya sido aislada en alubia. El segundo hecho fue que la cepa que mejor funcionó en alubia (RVPB 2-2) fue también la que peor lo hizo en pimiento.

Evaluación de microorganismos en planta

Tabla 3.11. Biomasa producida tras tres meses de crecimiento, por plantas de pimiento inoculadas en condiciones gnotobióticas con diferentes bacterias endofíticas frente a un control sin inocular. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento: Cepa inoculada	Biomasa aérea seca (g)		Biomasa de la raíz seca (g)		Biomasa aérea fresca (g)
RVPB 2-2	0,609	a	0,559	abc	4,80
SRN 3-2	0,646	ab	0,488	ab	4,92
SCFB 3-1	0,671	abc	0,592	abc	5,10
FVA 1-4	0,680	abc	0,581	abc	5,39
VCC 3-3	0,686	abc	0,494	ab	5,45
SCFB 1-1	0,718	abc	0,516	ab	6,10
Control sin inocular	0,726	abc	0,509	ab	5,40
RVPB 1-2	0,733	abc	0,584	abc	5,54
RVSV 1-5	0,743	abc	0,569	abc	5,97
SCB 3-1	0,755	abc	0,549	abc	6,06
RVSV 1-3	0,772	abc	0,546	abc	5,89
RVPB 1-1	0,773	abc	0,536	abc	6,23
VCV 3-2	0,778	bc	0,543	abc	6,09
FCB 2	0,803	bc	0,471	a	6,12
RVPB 2-1	0,803	bc	0,575	abc	6,18
PPSB 2-2	0,804	bc	0,638	bc	6,00
BSC 1-2	0,823	c	0,702	c	6,38
Media cuadrática	0,030		0,026		3,809
F	3,431***		2,902***		0,885 ns

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05.

#### 4.4 Inoculación de combinaciones binarias de microorganismos para detectar compatibilidad, con la finalidad de estimular el crecimiento vegetal en microcosmos

Para la inoculación de las plantas en esta fase de la investigación se eligieron los microorganismos que mayor efecto promotor de crecimiento vegetal proporcionaron en condiciones axénicas. Se escogieron dos aislados de hongos AM, uno aislado del suelo de la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente” (procedente del suelo SCFB y del morfotipo A), y otro procedente de la IGP “Alubia de La Bañeza-León” (procedente del suelo RVPB y del morfotipo F), cuyo efecto como promotores de crecimiento se observó en las plantas de puerro. Los parámetros de crecimiento que se tomaron en cuenta para la elección de las cepas bacterianas se describen en los siguientes apartados.

##### 4.4.1 Inoculación de plantas de alubia con combinaciones binarias de hongos AM, PGPR y rizobios

Para valorar el efecto promotor del crecimiento vegetal de las cepas bacterianas, el criterio seleccionado fue biomasa aérea seca. Aunque la biomasa seca de la raíz es un parámetro importante debido a que la estimulación del crecimiento de la raíz puede tener un efecto beneficioso para la nutrición de las plantas, y como consecuencia un mayor rendimiento del cultivo, como ya se ha indicado, la correlación entre el desarrollo de la raíz y de la parte aérea es significativa y de signo positivo, por lo que aunque en distinta magnitud, un incremento en el desarrollo de la parte aérea lleva aparejado un incremento en el de la raíz. En consecuencia se seleccionaron las siguientes cepas:

- RVPB 2-1: *S. maltophilia*, por tratarse de la cepa que mejores resultados produjo en inoculación independiente.
- RVPB 2-2: *P. brassicearum* subsp. *neoauriantaca*, por tratarse de la cepa que mejor resultados produjo en coinoculación con LCS0306 de *R. leguminosarum*, y simultáneamente la segunda mejor en inoculación independiente.

Las combinaciones binarias micorrizas + rizobio produjeron diferencias significativas para rendimiento de grano y biomasa aérea total, pero no para el índice de cosecha. En cuanto a los componentes del rendimiento, las diferencias fueron significativas para el número de semillas por vaina (Tabla 3.12). El rendimiento más elevado se produjo en el control con nitrógeno, pero los dos tratamientos inoculados produjeron rendimientos superiores al control sin inocular, lo que depende en mayor medida del número de semillas por vaina (Tabla 3.12). Aunque estadísticamente no sea significativo, se observa que para

todos los parámetros, a excepción de vainas por planta, los valores de los tratamientos micorrizas + rizobio fueron superiores a los valores del control sin inocular.

Tabla 3.12. Comparación de los valores medios de seis variables dependientes, obtenidos en el experimento en microcosmos con alubia, sin fertilización con nitrógeno, e inoculada con dos combinaciones binarias micorrizas (A, F) + *R. leguminosarum* (LCS0306), frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento: Cepa inoculada	Biomasa aérea seca por planta (g)		Índice de cosecha	Vainas por planta	Semillas por vaina		Peso seco 1000 semillas (g)	Rendimiento por planta (g)	
Control sin N	3,60	a	0,472	2,75	1,92	a	359,7	1,70	a
A + LCS0306	4,19	a	0,501	2,58	2,41	ab	389,2	2,09	b
F + LCS0306	4,31	a	0,516	3,08	2,10	ab	367,8	2,18	b
Control 100% N	5,56	b	0,515	3,17	2,89	b	364	2,82	c
Media Cuadrática	8,165		0,005	0,910	2,165		2067,410	2,597	
F	11,602***		1,210ns	1,151ns	3,354*		0,125ns	21,006***	

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

En cuanto a las combinaciones binarias micorrizas + PGPR, se presentaron diferencias significativas para las mismas variables indicadas en el caso anterior (Tabla 3.13).

También en este caso, los rendimientos significativamente más altos se alcanzaron en el control con el 100% del nitrógeno, y los más bajos en el control sin inocular. Con tres de los cuatro tratamientos de inoculación, se alcanzaron rendimientos superiores al testigo sin inocular, la única combinación binaria que no difirió del control fue la realizada entre la micorriza A y la cepa de PGPR RVPB 2-1 (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Comparación de los valores medios de seis variables dependientes, obtenidos en el experimento en microcosmos con alubia, sin fertilización con nitrógeno, e inoculada con dos combinaciones binarias micorrizas (A, F) + PGPR, frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Biomasa aérea seca por planta(g)		Índice de cosecha	Vainas por planta	Semillas por vaina		Peso seco 1000 semillas (g)	Rendimiento por planta (g)	
Control sin N	3,60	a	0,472	2,75	1,92	a	359,7	1,70	a
A + RVPB 2-1	4,04	a	0,449	2,25	2,40	ab	370,0	1,79	ab
A + RVPB 2-2	4,25	a	0,487	2,75	2,00	ab	409,3	2,04	bc
F + RVPB 2-2	4,38	a	0,483	2,50	2,47	ab	391,9	2,10	c
F + RVPB 2-1	4,18	a	0,524	2,75	2,22	ab	374,5	2,13	c
Control 100%N	5,56	b	0,515	3,17	2,89	b	364,0	2,82	d
Media Cuadrática	5,206		0,009	1,122	1,506		4278,030	1,882	
F	9,687***		1,884ns	0,087ns	0,036*		0,896ns	41,570***	

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

Las combinaciones binarias entre las PGPR y el rizobio, se comportaron de la misma manera que en los casos anteriores (Tabla 3.14). De nuevo el rendimiento de los tratamientos inoculados superó significativamente al control sin inocular, pero fue inferior al control fertilizado con todo el nitrógeno.

Por lo tanto, se observa que hay un efecto promotor del crecimiento vegetal en la mayor parte de los tratamientos. En el caso de la inoculación con la cepa de *R. leguminosarum*, de probada eficiencia en la variedad de alubia "Riñón" (Mulas et al., 2011), puede pensarse que no existe efecto promotor del crecimiento vegetal, sino fijación de nitrógeno atmosférico, y que es el aporte de este nutriente el que provoca el mayor rendimiento. Sin embargo, también se han observado mejoras del rendimiento de la misma magnitud, cuando se inoculó con microorganismos no rizobios.

Tabla 3.14. Comparación de los valores medios de seis variables dependientes, obtenidos en el experimento en microcosmos con alubia, sin fertilización con nitrógeno, e inoculada con dos combinaciones binarias PGPR + *R. leguminosarum* (LCS0306), frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento: Cepa Inoculada	Biomasa aérea seca por planta (g)		Índice de cosecha	Vainas por planta	Semillas por vaina		Peso seco 1000 semillas (g)	Rendimiento por planta (g)	
Control 25%N	3,60	a	0,470	2,75	1,92	a	359,7	1,70	a
LCS0306 + RVPB 2-2	4,20	ab	0,500	2,63	2,33	ab	360,2	2,09	b
LCS0306 + RVPB 2-1	4,64	b	0,510	2,83	2,50	ab	360,8	2,34	b
Control 100 %N	5,56	c	0,520	3,17	2,89	b	364,0	2,82	c
Media Cuadrática	8,186		0,005	0,644	1,947		46,059	2,649	
F	14,505***		1,114ns	1,131ns	3,343*		0,004ns	35,301***	

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

Hay que tener en cuenta que la eficiencia de la fijación de nitrógeno resulta negativamente afectada cuando se trabaja en condiciones de microcosmos. Las razones pueden ser múltiples, pero hasta el momento, se ha demostrado que las temperaturas anormales que se alcanzan en el interior de la maceta pueden ser causa fundamental. En especial las temperaturas elevadas afectan al proceso de nodulación y a la función del nódulo (Hungria y Vargas, 2000). Estudios realizados anteriormente (Díaz-Alcántara, 2010; Mulas, 2010; Mulas et al., 2013) demuestran que en microcosmos la inoculación con rizobios tienen un efecto errático sobre el rendimiento, al contrario de lo que sucede en campo, por lo que el microcosmos no es un buen medio para extraer conclusiones sobre biofertilizantes, siendo necesario realizar ensayos en campo. Los resultados confirman este dato.

De todas las combinaciones binarias probadas, solamente la formada por la micorriza A y la bacteria endófito RVPB 2-1 podría tener interacciones negativas, ya que no produjo una mejora del rendimiento con respecto al control sin inocular, lo que si sucedió para las demás combinaciones. Las interacciones entre micorrizas y PGPR pueden ser interferencias o interacciones beneficiosas (Gryndler, 2000). Varios estudios indican que los microorganismos considerados PGPR no suelen ejercer un efecto antimicrobiano contra las micorrizas AM (Edwards et al., 1998; Vázquez et al., 2000; Barea et al., 2004). Sin embargo un trabajo de

Toljander et al. (2006) demuestra que algunas bacterias del tipo PGPR – en concreto una cepa de *P. fluorescens* y otra de *Paenibacillus brasiliensis* – atacan las hifas de algunos hongos AM, mientras que Artursson (2005) comprobó que la misma cepa de *P. brasiliensis* incrementa el grado de colonización de las raíces de trébol por parte de *G. mosseae*.

A pesar de las limitaciones que tienen los ensayos en microcosmos, que ya han sido analizadas, parece claro que la combinación más desfavorable es A con RVPB 2-1, mientras que las demás son favorables sin existir diferencias significativas entre ellas.

En consecuencia son igualmente viables las siguientes combinaciones ternarias:

- Micorriza F + PGPR RVPB 2-1 *S. chelatiphaga* + *R. leguminosarum* LCS0306
- Micorriza F + PGPR RVPB 2-2 *P. brassicacearum* subsp. *neauriantaca* + *R. leguminosarum* LCS0306
- Micorriza A + PGPR RVPB 2-2 *P. brassicacearum* subsp. *neauriantaca* + *R. leguminosarum* LCS0306

De las tres, se eligió para la fase de ensayo de biofertilizantes en campo, la segunda, F + RVPB 2-1 + rizobio LCS0306.

#### 4.4.2 Inoculación de plantas de pimiento con combinaciones binarias de hongos AM, PGPR y rizobios

Para la inoculación de las plantas de pimiento se utilizaron los morfotipos A y F de hongos AM, descritos al inicio de esta sección. Al igual que en alubia, para valorar el efecto promotor del crecimiento vegetal, el criterio seleccionado fue el de biomasa aérea seca. Las cepas seleccionadas fueron las siguientes:

- BSC 1-2 *A. spiritinus*, por tratarse de la cepa que mejores resultados produjo, con respecto al criterio elegido.
- PPSB 2-2 *E. ludwigii*, por tratarse de la segunda mejor cepa.
- LET 1910, por tratarse de la cepa de *R. leguminosarum* de mayor efecto promotor del crecimiento.

La variable dependiente analizada fue biomasa aérea seca en el momento de inicio de la floración de las plantas, y no resultó significativamente afectada por ninguno

de los tratamientos, en ninguno de los tipos de combinaciones binarias (Tabla 3.15).

La biomasa aérea seca media de las plantas del control con nitrógeno fue superior a las del control sin nitrógeno, pero ni siquiera esta diferencia fue significativa (Tabla 3.15). Las plantas inoculadas tuvieron un desarrollo intermedio entre los dos controles, salvo la combinación binaria entre la PGPR PPSB 2-2 y el rizobio LET1910 que superó ligeramente al control con nitrógeno, pero la falta de significación hace que no se puedan extraer conclusiones.

También existen indicios de que las combinaciones binarias probadas son compatibles, es decir que no existe interacción negativa, pues todos los tratamientos superan numéricamente al control sin inocular, pero la falta de significación estadística reduce de nuevo la robustez de este resultado.

Tabla 3.15. Comparación de los valores medios para la variable dependiente biomasa aérea seca, obtenidos en el experimento en microcosmos con pimiento, fertilizada con un 25% de las extracciones estimadas de nitrógeno, e inoculado con las combinaciones binarias: Micorrizas + *R. leguminosarum*, Micorrizas + PGPR, y PGPR + *R. leguminosarum* (LET1910), frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ )

Micorrizas + <i>R. leguminosarum</i>		Micorrizas + PGPR		PGPR + <i>R. leguminosarum</i>	
Tratamiento	Biomasa aérea seca (g)	Tratamiento	Biomasa aérea seca (g)	Tratamiento	Biomasa aérea seca (g)
Control 25% N	2,98	Control 25% N	2,97	Control 25%N	2,93
F + LET1910	3,22	A + BSC 1-2	3,18	LET1910 + BSC 1-2	3,06
A + LET1910	3,27	F + BSC 1-2	3,22	Control 100% N	3,27
Control 100% N	3,29	F + PPSB 2-2	3,27	LET1910 + PPSB 2-2	3,29
		A + PPSB 2-2	3,29		
		Control 100% N	3,43		
Media Cuadrática	0,252	Media Cuadrática	0,271	Media Cuadrática	0,359
F	0,574ns	F	0,682ns	F	0,697ns

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

Existieron limitaciones en la ejecución de este ensayo. Por una parte el cultivo no había cerrado ciclo, lo que no es viable en una maceta para este tipo de cultivo. Si el cultivo hubiera llegado a la fase de producción, es posible que se hubieran apreciado mejor las diferencias, ya que la alubia llegó a la fase productiva y se

observaron estas diferencias. Por otra parte, ya se ha indicado que en las condiciones del microcosmos la simbiosis rizobios-leguminosas es afectada negativamente, y por lo que se ha demostrado en este ensayo, la planta tampoco es capaz de expresar por si misma todo su potencial en estas condiciones, y por extensión la interacción entre planta y microorganismo tampoco.

Caben dos interpretaciones, la primera es considerar que los inoculantes no tienen efectos sobre las plantas, pero se descarta al observar que tampoco se han observado diferencias significativas entre el control fertilizado con nitrógeno y sin fertilizar. La segunda es que las condiciones limitantes del microcosmos y no haber permitido cerrar el ciclo hayan afectado negativamente a la respuesta de la planta.

Debido a la debilidad de los resultados obtenidos en microcosmos, la elección de la cepa de PGPR a utilizar en los ensayos de campo no se basó en dichos resultados, sino en el criterio de emplear una cepa autóctona de un taxón que los antecedentes existentes lo confirmen como PGPR (Mular et al. 2013).

En este caso, como micorriza se eligió el inóculo A, y por tanto se probó el efecto de la combinación ternaria: A + rizobio LET1910 + *B. siamensis* SCFB 3-1.

#### **4.5 Inoculación en campo de microorganismos promotores de crecimiento en plantas de alubia variedad Riñón y pimiento morrón ecotipo “de Fresno”**

Los datos del experimento de campo con alubia Riñón y pimiento de Fresno llevado a cabo durante el año 2012, en León, 42° 35' 3.6888", -5° 35' 22.0986" (Figura 3.5), se analizaron utilizando herramientas estadísticas como análisis de varianza. Aunque el diseño experimental ejecutado para cada cultivo consistió en Bloques Completos al Azar, en los cuadros con los datos del análisis de varianza solo se incluyen los valores para tratamientos ya que el bloque no fue estadísticamente significativo, y por el valor bajo de F es aconsejable eliminarlo del análisis.

##### **4.5.1 Ensayo en alubia**

Los resultados del ANOVA mostrados en la tabla 3.16, indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para todas las variables analizadas. Se observó que los valores medios significativamente más bajos para casi todas las variables dependientes correspondieron al control sin fertilización nitrogenada. Sin embargo, el escaso número de vainas por planta en este control que llegó a ser incluso la mitad que en algunos tratamientos, y el menor número

de semillas por vaina, hizo que el tamaño de la semilla fuera significativamente mayor que en los tratamientos restantes, pero aún así el rendimiento total fue casi la mitad que en algunos de ellos (Tabla 3.17).



Figura 3.5. Experimento de campo en León.

Por el contrario, los valores medios más altos de las variables dependientes, se presentaron en el tratamiento inoculado con tres microorganismos: el hongo micorrícico *G. mosseae* (F), la bacteria promotora de crecimiento *P. brassicearum* subsp. *neaurantiaca* (RVPB 2-2) y el rizobio *R. leguminosarum* (LCS0306), que en algunos casos llegó a ser casi el doble del valor medio del tratamiento sin fertilización nitrogenada (Tabla 3.17). En términos generales, se observó un incremento en los valores de las variables analizadas, como consecuencia de la inoculación. Por lo tanto, se observa una mejora en el rendimiento con respecto al tratamiento inoculado solo con el rizobio, siendo el mejor rendimiento el del tratamiento inoculado con el rizobio, la PGPR y el hongo micorrícico (Tabla 3.17). Estadísticamente, este último tratamiento fue el que difirió tanto del tratamiento sin fertilización nitrogenada, como del tratamiento con 100% N para casi todas las variables dependientes analizadas.

Tal como ya demostraron Mulas et al. (2011) la inoculación de alubia variedad “Riñón” con la cepa LCS0306 de *R. leguminosarum* en suelos de la IGP “Alubia de La Bañeza-León”, produce el mismo rendimiento que la fertilización con nitrógeno mineral, con lo que se confirma que es posible sustituir el abonado nitrogenado por la inoculación. En este estudio se comprobó además, que la inoculación con tres microorganismos: el hongo micorrícico, la PGPR y el rizobio, produjo un rendimiento incluso mayor que el de la fertilización con nitrógeno mineral y que incluso superó al rendimiento obtenido con la inoculación en solitario con el rizobio.

Diversos estudios apoyan el hecho de que la coinoculación produce mejores efectos que la inoculación con un solo microorganismo en el desarrollo de las plantas, y en específico en leguminosas. (Geneva et al., 2006), obtuvieron un

incremento en la biomasa, la tasa fotosintética, la fijación de N y la nodulación en plantas de guisante, cuando se inocularon con *G. mosseae* y *R. leguminosarum* en comparación con la inoculación solo con *R. leguminosarum*. Valdenegro et al. (2001) realizaron un estudio en alfalfa arbórea inoculando *R. meliloti*, *Glomus* spp. y una PGPR, y en todos los casos los mejores resultados se obtuvieron con la inoculación de la micorriza asociada con los otros microorganismos.

Aunque existen estudios en que la coinoculación de leguminosas con rizobios y PGPR mejoró los parámetros de crecimiento (Guiñazú et al., 2010), en este estudio la acción de la PGPR aunque mejora estos parámetros, esta mejora no es estadísticamente significativa. Sin embargo, la acción de la micorriza es determinante en la mejora del rendimiento y sus componentes, tal como lo demostraron Medina et al. (2003) en alfalfa. Estos autores también encontraron que el efecto de la micorriza y la PGPR dependía de la especie de éstas, y además que la acción positiva sobre el aumento de la biomasa, estaba relacionada con la mejora en la eficiencia del uso por parte de la planta de N y no de P.

Los contrastes ortogonales permiten deducir de manera más certera cuáles tratamientos influyen en mayor o menor medida al comportamiento del experimento.

En el primer contraste realizado, se comparó la acción del tratamiento sin fertilización con N, con los tratamientos que fueron inoculados y que no contenían ningún tipo de fertilización nitrogenada. Según se observa en la tabla 3.16 y 3.18, figuras 3.6 y 3.7, prácticamente para todas las variables analizadas, existen diferencias significativas, presentando valores mayores todos los tratamientos inoculados con microorganismos, lo que constituye un fuerte indicio estadístico de que la inoculación con microorganismos tiene un claro efecto en la promoción del crecimiento.

Con el objetivo de evaluar si la acción de los inoculantes podría reemplazar al abono nitrogenado, se comparó el tratamiento fertilizado con el 100% de N con los tratamientos inoculados. Al igual que en el contraste anterior hubo diferencias significativas tanto en el rendimiento como en sus componentes (número de vainas por planta y número de semillas por vaina), en el índice de cosecha y en la concentración de nutrientes. Los valores fueron superiores en los tratamientos inoculados con microorganismos que en el tratamiento con 100% fertilización nitrogenada, confirmando lo que mostraba el análisis de varianza de los tratamientos: es posible sustituir la fertilización con nitrógeno por la inoculación de microorganismos.

En el siguiente contraste se evaluó la acción de la PGPR en coinoculación con el rizobio. Estadísticamente no hubo diferencias significativas en las variables

analizadas (excepto en la concentración de Ca en semillas), sin embargo, se observaron valores ligeramente mayores del rendimiento y su componente vainas por planta y del índice de cosecha y biomasa aérea en los tratamientos coinoculados.

Asimismo, se comparó los tratamientos inoculados con bacterias, ya sea con rizobios y PGPR o solamente con rizobio, contra el tratamiento inoculado con los tres microorganismos. Se observó que los valores de todas las variables analizadas, fueron mayores en el tratamiento que incluye la micorriza. Estas diferencias fueron significativas para el contenido de nutrientes, el rendimiento y su componente vainas por planta; no así para el número de semillas por vaina, por lo que la significancia en el rendimiento se debe al número de vainas por planta. Aunque las diferencias en la biomasa aérea fueron significativas, no lo fueron en el índice de cosecha.

Finalmente se hizo un último contraste, comparando el tratamiento inoculado con el rizobio y la PGPR con el tratamiento con los tres inoculantes para evaluar directamente la acción del hongo micorrízico en el experimento. Los resultados mostraron una clara acción positiva del hongo en la inoculación, siendo el tratamiento con los tres inoculantes el que presentó valores estadísticamente significativos mayores en todos los parámetros evaluados: nutrientes, rendimiento y sus componentes e índice de cosecha.

En cuanto a la concentración de elementos químicos en el grano, no hubo diferencias significativas para ninguno de ellos (Tabla 3.19). Aunque se trate solamente de indicios por no haber significación estadística, merece la pena destacar que con la inoculación ternaria la concentración de fósforo fue más baja que en los demás casos.

Sin embargo la cantidad total de los diferentes elementos acumulada en el grano fue significativamente más baja en el control sin inocular y sin fertilizar que en el resto de los tratamientos, y significativamente más elevada en el tratamiento con inoculación ternaria, con respecto a los demás, al menos en los tres macronutrientes, con patrones de variación parecidos aunque con alguna diferencia en la significación, para el resto de los elementos químicos. Estas diferencias se deben a las diferencias de biomasa total de grano producida en los distintos tratamientos, y no a la concentración de elementos en el grano.

Tabla 3.16. Valores de la media cuadrática en el ANOVA para tratamientos y contrastes ortogonales entre tratamientos, de 11 variables dependientes, correspondiente al experimento con alubia Riñón en campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes.

Fuente de Variación	g.l	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Vainas /planta	Semillas /vaina	Biomasa seca 1000 semillas (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Tratamientos	5	32499,76***	293455,15***	5,07***	6163,75***	663,06***	2,021e7***	249,66***	801469,23***	4213386,77***	199709,15***	90692,51***
Sin fertilización nitrogenada vs. inoculados	1	4182,96***	34050,54***	0,005*	856,45***	9,08***	414305,49**	7407029,45***	87560,02***	464909,76***	16861,56***	11649,52***
100 % fertilización nitrogenada vs. inoculados	1	663,50*	2979,66	0,006*	89,26*	0,79	3389,58	897123,12*	13329,95*	83464,17*	7881,15**	2786,70**
Inoculado con <i>R. leguminosarum</i> vs. coinoculado con <i>P. brassicacearum</i>	1	42,35	970,8	0,002	13,24	1,49	1085,64	143550,77	256,3	70,144	10308,82**	293,23
Inoculado con bacterias y micorriza vs. inoculados con bacterias	1	1544,76***	6783,28*	0,019	302,68***	0,59	122996,48	1953539,67**	19326,60*	250767,72***	6356,94*	2802,14**
Inoculado solo con <i>R. leguminosarum</i> y <i>P. brassicacearum</i> vs. inoculado con bacterias y micorriza	1	32499,77***	293455,15***	5,07***	6163,75***	663,062***	20207774,02***	1042434,39*	12600,27*	191725,46**	334,25	1389,9

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05.

g.l: Grados de libertad; IC: Índice de cosecha.

Tabla 3.17. Comparación de los valores medios de 11 variables dependientes obtenidas en el experimento de campo con alubia Riñón, inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea(g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Vainas/planta	Semillas/vaina	Biomasa seca 1000 semillas (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Control sin fertilización nitrogenada	17,8 a	54,28 a	0,32 a	7,53 a	3,34 a	730,9 b	719,35a	91,84a	209,81a	48,95a	30,09a
Control 100% N	24,3 b	75,93 b	0,32 a	10,83 b	3,69 ab	633,4 ab	1015,09b	121,92b	275,30b	55,795a	39,28ab
LCS0306	25,6 b	77,00 b	0,32 a	11,01 b	3,92 b	647,7 ab	1051,92b	131,31bc	294,80b	55,53a	43,21b
LCS0306 +RVPB 2-2	26,9 bc	83,36 b	0,33 ab	11,75 bc	3,67 ab	640,9 ab	1129,26bc	134,63bc	293,09b	76,253b	46,71bc
F + LCS0306 + RVPB 2- 2	33,2 c	94,74 b	0,35 b	14,45 c	3,93 b	582,3 a	1337,67c	157,54c	382,47c	79,98b	54,32c

IC: Índice de cosecha.

Tabla 3.18. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para 11 variables dependientes, obtenidos en el experimento de campo con alubia Riñón, inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles.

Contrastes	Valores medios de cada contraste	Código gráficos	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Vainas/planta	Semillas /vaina	Biomasa seca 1000 semillas (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Sin fertilización nitrogenada vs. inoculados	Sin fertilización nitrogenada	SF	17,78	54,28	0,32	7,53	3,34	730,96	719,35	91,84	209,81	48,95	30,09
	Inoculados	I	28,56	85,04	0,33	12,40	3,84	623,68	1172,95	141,16	323,45	70,59	48,08
100 % fertilización nitrogenada vs. inoculados	Fertilización con 100% N	F	24,27	75,94	0,32	10,83	3,69	633,38	1015,09	121,92	275,30	55,79	39,28
	Inoculados	I	28,56	85,04	0,33	12,40	3,84	623,68	1172,95	141,16	323,45	70,59	48,08
Inoculado con <i>R. leguminosarum</i> vs. coinoculado con <i>P. brassicacearum</i>	Inoculado con <i>R. leguminosarum</i>	Rh	25,58	77,00	0,32	11,01	3,92	647,71	1051,92	131,31	294,80	55,53	43,21
	Coinoculado con <i>P. brassicacearum</i>	Rh+ PGPR	26,91	83,36	0,33	11,75	3,67	640,98	1129,26	134,63	293,09	76,25	46,71

Tabla 3.18. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para 11 variables dependientes, obtenidos en el experimento de campo con alubia Riñón, inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles. (Continuación)

Contrastes	Valores medios de cada contraste	Código gráficos	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Vainas/planta	Semillas/vaina	Biomasa seca 1000 semillas (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Inoculado con bacterias y micorriza vs. inoculados con bacterias	Inoculado con bacterias y micorriza	Rh+PGPR +M	33,19	94,74	0,35	14,45	3,93	582,35	1337,67	157,54	382,47	79,98	54,32
	Inoculados con bacterias	Rh y Rh+PGPR	26,25	80,18	0,32	11,38	3,80	644,34	1090,59	132,97	293,94	65,89	44,96
Inoculado solo con <i>R. leguminosarum</i> y <i>P. brassicacearum</i> vs. inoculado con bacterias y micorriza	Inoculado solo con <i>R. leguminosarum</i> y <i>P. brassicacearum</i>	Rh+PGPR	26,91	83,36	0,33	11,75	3,67	640,98	1129,26	134,63	293,09	76,25	46,71
	Inoculado con bacterias y micorriza	Rh+PGPR +M	33,19	94,74	0,35	14,45	3,93	582,35	1337,67	157,54	382,47	79,98	54,32

Tabla 3.19. Contenido de N, P, K, Ca, Mg en el grano de alubia, en el experimento de campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes frente a dos controles.

Tratamiento	N (%)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)
Control sin fertilizar	4,01	5098,1	11622,5	2846,6	1693,1
F + LCS0306 + RVPB2-1	4,04	4765,7	11581,5	2407,8	1640,9
LCS0306	4,13	5146,8	11550,2	2112,4	1688,2
Control 100% N	4,17	5044,0	11380,2	2312,6	1619,4
LCS0306 + RVPB2-1	4,19	5002,5	10917,2	2771,1	1734,2
Media cuadrática	0,020	65516,583	253456,981	290181,486	6201,273
F	0,561 ns	1,065 ns	0,509 ns	0,773 ns	1,141 ns

#### 4.5.2 Ensayo en pimiento

La inoculación en campo de plantas de pimiento, produjo diferencias significativas entre tratamientos para casi todas las variables dependientes analizadas, con excepción del número de frutos por planta, cuyas diferencias no fueron significativas (Tabla 3.20). Al igual que en alubia, los valores más altos de los tratamientos inoculados para todas las variables que mostraron diferencias significativas, se obtuvieron en el tratamiento inoculado con 3 microorganismos: micorriza (A); rizobio, *R. leguminosarum* (LET1910) y bacteria PGPR, *B. siamensis* (SCFB 3-1). Además, este tratamiento presentó diferencias significativas con el control con fertilización reducida en nitrógeno (25% del nitrógeno teóricamente extraído por la planta), en todas las variables dependientes, excepto el índice de cosecha. En todos estos casos incluso en el índice de cosecha, la inoculación ternaria mostró valores más altos que el control con fertilización reducida.

Con respecto al tratamiento control con el 100% de la fertilización nitrogenada, éste no difirió significativamente del tratamiento con la inoculación ternaria. El rendimiento fresco y seco y el peso fresco medio de los pimientos, fueron mayores en el tratamiento con la inoculación ternaria que en el control con 100% N, de lo cual se desprende la aseveración de que al igual que en alubia, es posible sustituir la fertilización nitrogenada por los microorganismos inoculados.

Observando los componentes del rendimiento, se deduce que la diferencia de rendimiento se debió fundamentalmente a diferencias en el tamaño medio

alcanzado por cada pimiento. Sin embargo no hubo diferencias en el número de frutos por planta, lo que contrasta con el resultado obtenido para alubia, en el que las mejoras del rendimiento obtenidas con la inoculación se debieron al incremento del número de frutos (vainas) por planta.

Al igual que en leguminosas en no leguminosas también se ha descrito la clara acción PGPR de la coinoculación de hongos AM y bacterias. (Kim et al., 2010) obtuvieron un claro efecto en los indicadores de promoción de crecimiento como longitud de raíces y peso fresco en pimiento cuando se inoculó con la PGPR *Methylobacterium oryzae* y un consorcio de tres hongos AM. En un estudio hecho en plantas de lechuga, la coinoculación de *G. intraradices* y *B. subtilis* incrementó el crecimiento con respecto a la inoculación en solitario (Kohler et al., 2007).

En el análisis de los datos mediante contrastes ortogonales se observaron más claramente los efectos de los tratamientos inoculados (Tablas 3.20 y 3.22, figuras 3.8 y 3.9).

En el primer contraste realizado, se comparó la acción del tratamiento con fertilización reducida en nitrógeno (25% del N teóricamente extraído por la planta), con los tratamientos inoculados que recibieron la misma fertilización. Según se observa en los gráficos, para todas las variables analizadas a excepción del índice de cosecha y del número de frutos por planta, existen diferencias significativas, siendo mayores los valores en todos los tratamientos inoculados. Esto demuestra como se dijo anteriormente que las diferencias en el rendimiento se deben al peso medio de los pimientos y no al número de pimientos que dio la planta.

En el segundo contraste se comparó el tratamiento fertilizado con el 100% de N con los tratamientos inoculados y fertilizados con el 25% del N total. En este contraste los valores mayores, para casi todas las variables analizadas, se presentaron en el tratamiento fertilizado con el 100% de N, aunque estas diferencias no fueron significativas, salvo en el caso de concentración de N y Ca.

En el siguiente contraste se compararon los tratamientos inoculados con el rizobio *R. leguminosarum* contra el tratamiento que no se inoculó con el rizobio. Para casi todas las variables los valores fueron mayores en los tratamientos inoculados con el rizobio aunque estas diferencias no fueron significativas.

Otra de las confrontaciones que se realizaron fue entre los tratamientos inoculados con micorriza frente al tratamiento inoculado sin micorriza. Los tratamientos inoculados con micorriza fueron en su mayoría superiores a los tratamientos inoculados sin micorriza, aunque la mayoría de estas diferencias no fueron

significativas. Hubo diferencia significativa en el número de frutos por planta y por ende del rendimiento fresco, por lo que en este contraste estas diferencias en el rendimiento se deben al número de frutos y no a su peso.

La evaluación del efecto del rizobio se hizo mediante el contraste entre el tratamiento inoculado con la micorriza (A) y la PGPR (SCFB 3-1) y el tratamiento inoculado con la micorriza, la bacteria y el rizobio. Los valores de todas las variables fueron ligeramente superiores en el tratamiento inoculado con los tres microorganismos, lo que sugiere un posible efecto positivo del rizobio. No obstante estas diferencias fueron significativas en rendimiento seco y el componente peso fresco por fruto, índice de cosecha y concentración de N, Ca y Mg.

Finalmente con el objetivo de evaluar directamente la acción de la micorriza, se realizó el último contraste confrontando el tratamiento inoculado con el rizobio y la PGPR contra el tratamiento inoculado con el rizobio, la bacteria y la micorriza. En todas las variables analizadas los valores fueron mayores en el tratamiento inoculado con los tres microorganismos. Estas diferencias fueron significativas en el rendimiento fresco y seco, y en el peso fresco medio por fruto. Al igual que en casos anteriores las diferencias en el rendimiento se explican por las diferencias en el tamaño y no en el número de pimientos. Este resultado evidencia la acción positiva de la micorriza en el rendimiento.

En cuanto a la concentración de los elementos químicos en los frutos, no existieron diferencias significativas para ninguno de los analizados (Tabla 3.23). Se apunta una tendencia a que los tratamientos inoculados con micorrizas, y en especial la inoculación ternaria, tengan una concentración de nitrógeno en los frutos similar a la del control inoculado con el 100% del N. Al igual que sucedió en el caso de la alubia, la inoculación ternaria presentó menor concentración de fósforo.

La cantidad total de los elementos químicos acumulada en los frutos, presentó diferencias significativas, que a falta de diferencias en la concentración de éstos, dependieron de las diferencias en la biomasa seca total. De esta forma, el nitrógeno fue superior como cabía esperar en el control con el 100% de abonado, pero no difirió significativamente del tratamiento de inoculación ternario (Tabla 3.23). Hay que tener en cuenta que la eficiencia aparente en el uso de los nutrientes raramente supera el 50% (Neuens et al., 2003), por lo que la inoculación y especialmente la inoculación ternaria mejoran este parámetro, ya que habiendo recibido un 25% del nitrógeno con respecto al control, el contenido de nitrógeno extraído del suelo y acumulado en los frutos fue del 90% con respecto a dicho control. Por tanto hay un mejor aprovechamiento del nitrógeno añadido con el fertilizante y del remanente del suelo. Evidentemente el ensayo no

ha sido diseñado para medir la eficiencia aparente en el uso de los nutrientes, por lo que no es posible cuantificar con los datos disponibles, pero se trata de una línea que habría que profundizar en ensayos posteriores.

Otros parámetros químicos como el pH de los frutos y el contenido de sólidos solubles totales, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3.23). A pesar de la falta de significación de los resultados, llama la atención que el control con el 100% del nitrógeno presenta un pH ligeramente más bajo y un mayor contenido de sólidos solubles totales, lo que mejoraría las propiedades organolépticas del fruto, pues puede conferirle un carácter más sabroso, pero como se indica son tendencias no significativas estadísticamente. Además los caracteres organolépticos dependen de muchos otros factores entre los que destacan los compuestos aromáticos que no han sido abordados en este trabajo, y deberán serlo en otros futuros.

Con respecto a la evaluación de variables relacionadas con la calidad del fruto, Del Amor et al. (2008) probaron el efecto de *Pantoea* y *Azospirillum* en la calidad del fruto de pimiento, y encontraron que la inoculación no estaba relacionada con la mejora de las características de calidad del fruto de pimiento, En contraste, Rosso et al. (2010) evaluaron un inoculante comercial compuesto por una micorriza y una PGPR en pimiento, estos observaron que el grosor del pericarpo fue mayor en los frutos provenientes de plantas inoculadas y que por el contrario el contenido de azúcar fue menor, por lo tanto sí existía una correlación entre la inoculación y la calidad del fruto.

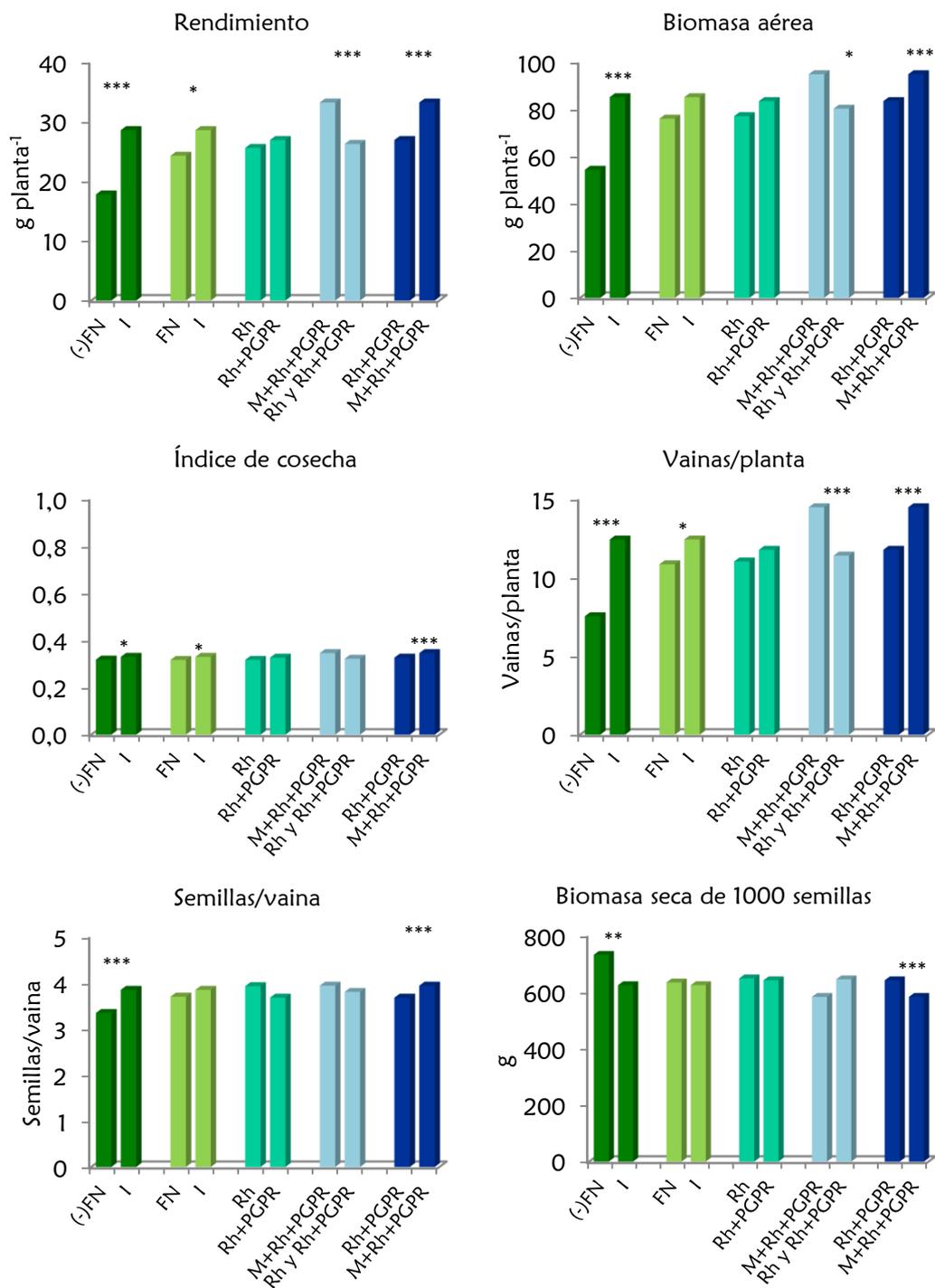
Si bien por cuestiones de espacio y optimización de recursos, no se planteó un tratamiento inoculado solamente con la micorriza y porque además el experimento de campo buscaba la acción de la coinoculación, los resultados estadísticos del análisis de varianza de los tratamientos de los contrastes ortogonales, apoyan el hecho de que la micorriza es fundamental en la acción biofertilizante del coinoculante. Lo que no se puede establecer es si la acción de la micorriza se debe a su efecto en solitario, extensamente documentado (Jeffries et al., 2003; Smith y Read, 2010), o si existe algún grado de sinergia con los demás componentes del inoculante, ya sea con la bacteria o con el rizobio. Al respecto Garbaye (1994) postuló que existen bacterias que promueven el desarrollo micorrízico, conocidas como MHB's, por su nombre en inglés "Mycorrhization Helper Bacteria". Estas bacterias podrán ser PGPR o rizobios, aunque la mayoría de las MHB pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Miransari, 2011), géneros a los que pertenecen las especies de PGPR utilizadas en la coinoculación de alubia y pimiento en campo (*P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* y *B. siamensis*, respectivamente).

Los efectos que ejercen estas bacterias sobre las AM micorrizas pueden ser en el establecimiento de la micorriza o más tarde en el mantenimiento de la simbiosis con el hospedero (Frey-Klett et al., 2007). Las MHB´s pueden influenciar la germinación de la espora, la absorción de P, la producción de fitohormonas, la exudación de la raíz y el crecimiento de los pelos radicales de la planta (Miransari, 2011); también pueden mitigar los efectos ambientales adversos en el crecimiento micelial y mejorar la toma de nutrientes y la fijación de nitrógeno (Frey-Klett et al., 2007), entre otros.

En los últimos años se han desarrollado estudios que apoyan el efecto MHB de diversas bacterias del suelo cuando se coinoculan con hongos AM. Este es el caso de *P. fluorescens* y *Rhizophagus intraradices* en tabaco, en donde la bacteria actúa mediante fitohormonas (Cosme y Wurst, 2013), *B. megaterium* y *G. intraradices* en maíz (Fernández Bidondo et al., 2012), *P. fluorescens* y *G. mosseae* en tomate (Gamalero et al., 2004) y *Bradyrhizobium japonicum* y *G. mosseae* en soja (Xie et al., 1995).

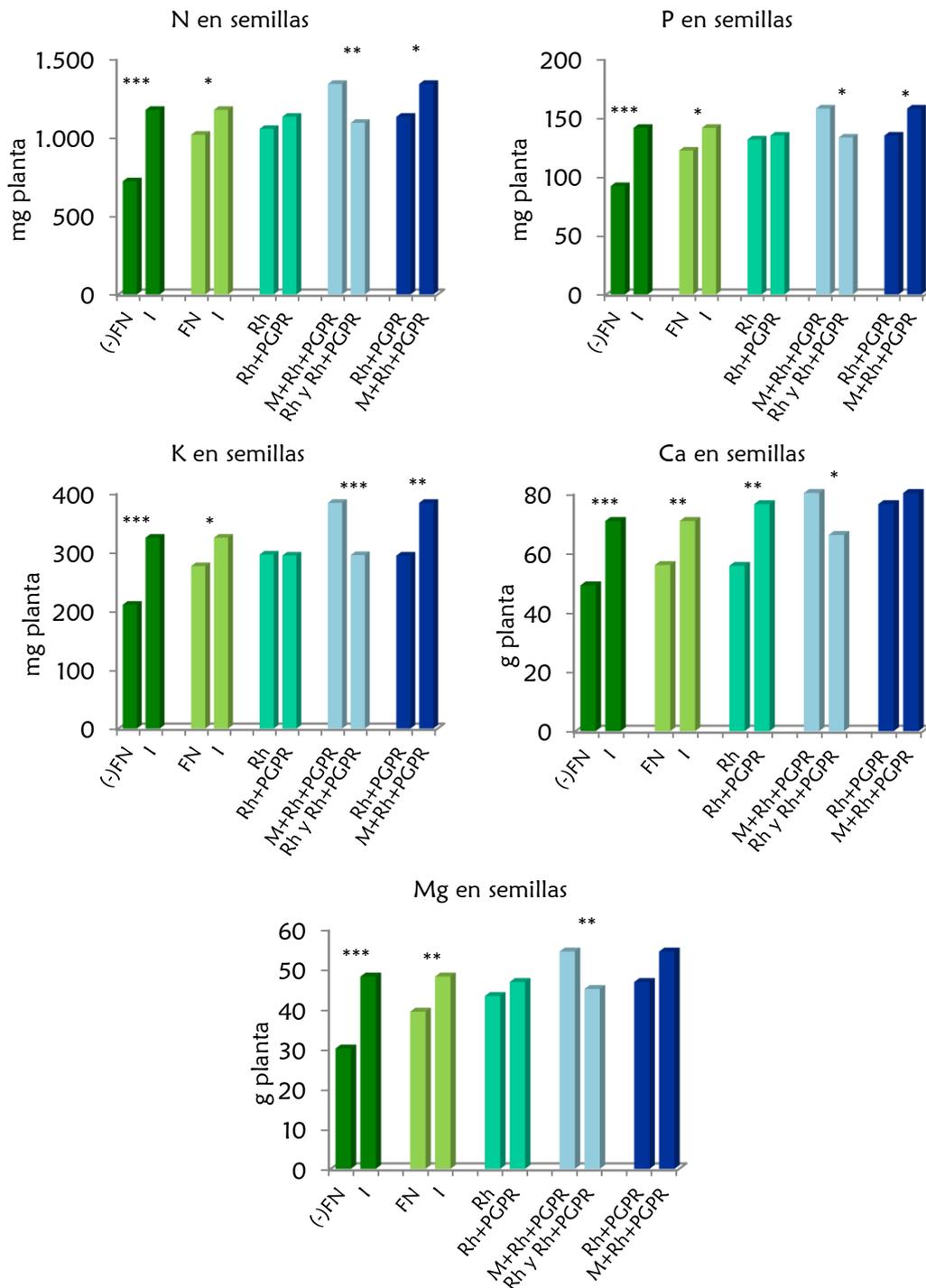
Sea cual sea la acción que ejerce la micorriza sobre la planta, es evidente que existe una clara acción promotora de crecimiento sobre la alubia y sobre el pimiento por parte de *G. mosseae* en coinoculación con las PGPR *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* y *B. siamensis* y con el rizobio *R. leguminosarum*, Este inoculante formulado con microorganismos autóctonos podría sustituir a la fertilización nitrogenada.

## Evaluación de microorganismos en planta



\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

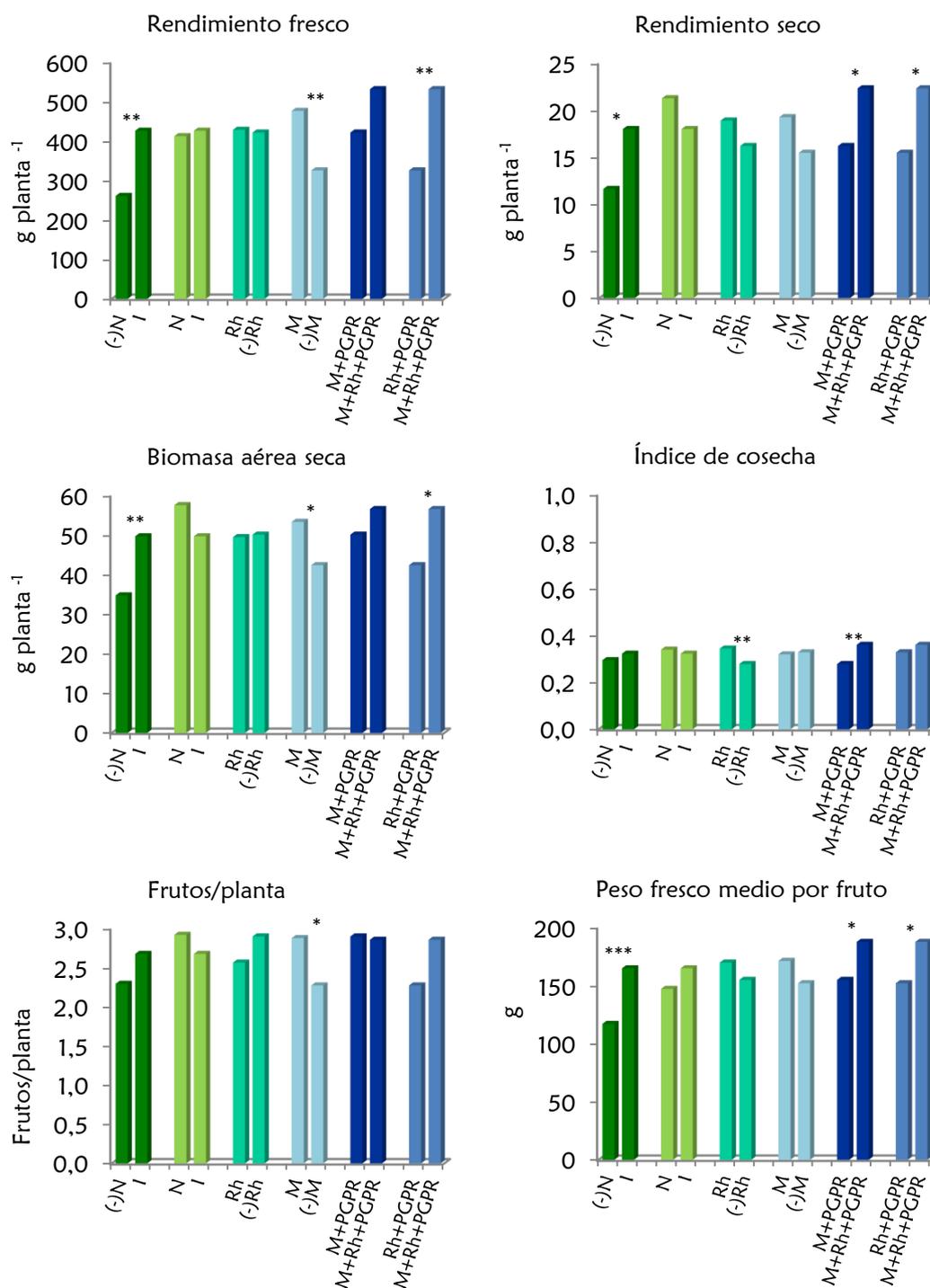
Figura 3.6. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes rendimiento, biomasa aérea, índice de cosecha, vainas por planta, semillas por vaina y biomasa seca de 1000 semillas, obtenidos en el experimento con alubia Riñón en campo inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles.



\*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

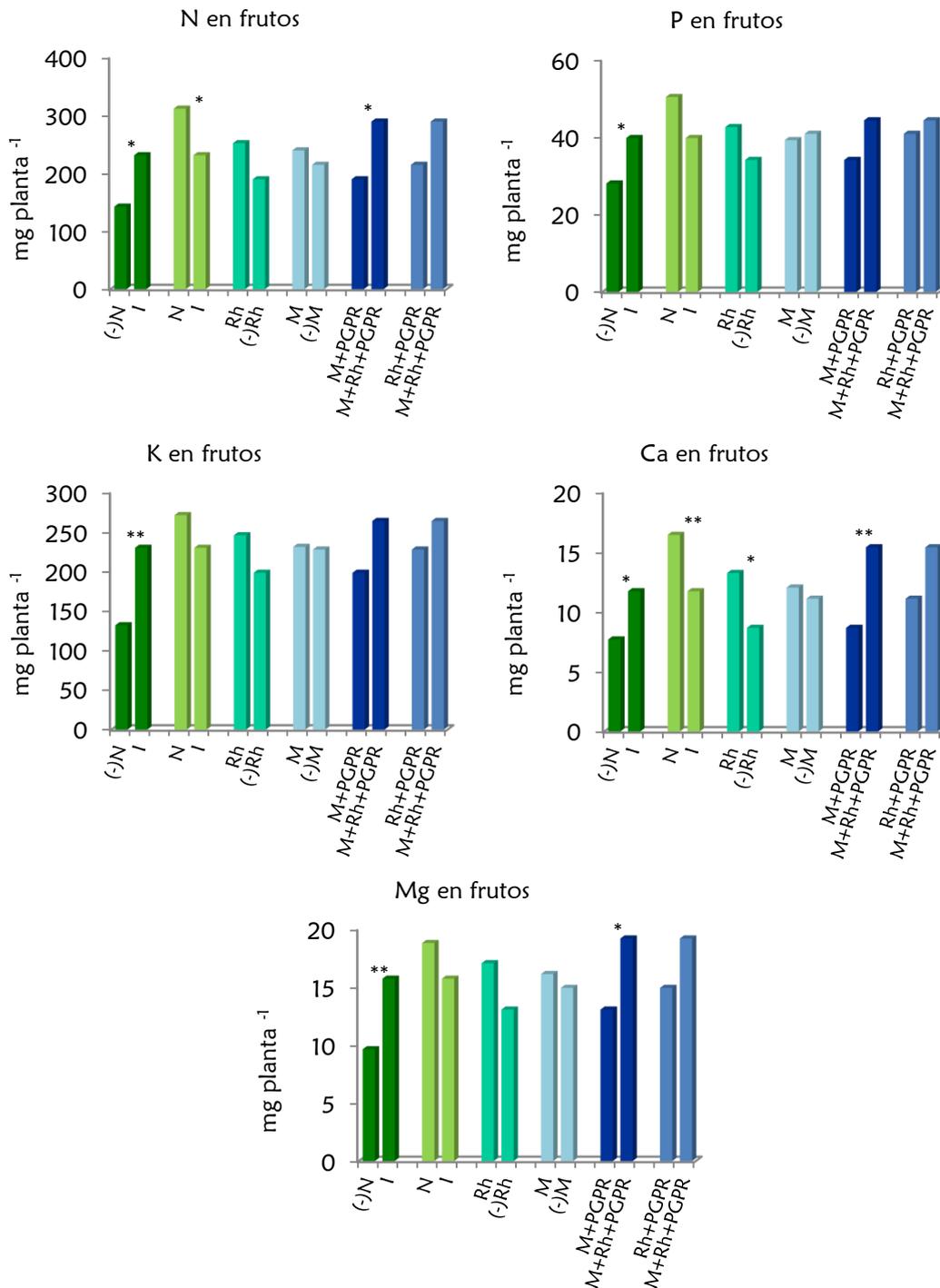
Figura 3.7. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes N, P, K, Ca y Mg en semillas, obtenidos en el experimento con alubia Riñón en campo inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles.

Evaluación de microorganismos en planta



\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

Figura 3.8. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes rendimiento fresco, rendimiento seco, biomasa aérea seca, índice de cosecha, frutos por planta y peso medio fresco por fruto, obtenidos en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles.



\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

Figura 3.9. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para las variables dependientes N, P, K, Ca y Mg en frutos, obtenidos en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles.

Tabla 3.20. Valores de la media cuadrática en el ANOVA para tratamientos y contrastes ortogonales entre tratamientos, de 11 variables dependientes, correspondiente al experimento con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” en campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes.

Fuente de Variación	g.l	Rendimiento fresco (g planta <sup>-1</sup> )	Rendimiento seco (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Frutos/planta	Peso fresco medio por fruto (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Tratamientos	5	507400,53***	933,05**	4497,06**	0,05*	5,34	28706,81***	235355,99***	3647,74*	153565,84**	738,48***	771,95**
Fertilización reducida en nitrógeno vs. inoculados	1	982659,17**	1462,07*	8003,68**	0,03	5,25	76747,85***	281993,75*	4960,50*	345240,46**	583,87*	1332,95*
100 % fertilización nitrogenada vs. inoculados	1	6875,17	385,41	2222,12	0,01	2,13	10878,28	231692,21*	4045,33	61260,99	799,01**	339,22
Inoculados con <i>R. leguminosarum</i> vs. inoculado sin <i>R. leguminosarum</i>	1	1530,89	233,95	12,32	0,14**	3,56	6427,57	123814,91	2305,49	71889,05	671,49*	510,534
Inoculados con micorriza vs. inoculado sin micorriza	1	728525,09**	459,18	3828,50*	0,003	11,68*	10719,38	19688,06	85,69	358,54	27,8	45,76

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05.

g.l: Grados de libertad; I.C: Índice de cosecha.

Tabla 3.20. Valores de la media cuadrática en el ANOVA para tratamientos y contrastes ortogonales entre tratamientos, de 11 variables dependientes, correspondiente al experimento con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” en campo para comparar el efecto de 3 biofertilizantes (Continuación).

Fuente de Variación	g.l	Rendimiento fresco (g planta <sup>-1</sup> )	Rendimiento seco (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Frutos/planta	Peso fresco medio por fruto (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Inoculado con micorriza y <i>B. amyloliquefaciens</i> vs. inoculado con micorriza, <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	1	289410,84	902,60*	1003,02	0,16**	0,04	23732,25*	237479,65*	2509,93	102740,8	1086,76**	899,76*
Inoculado con <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> vs. inoculado con micorriza, <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	1	1016405,04**	1127,23*	4819,20*	0,024	8,17	28120,5*	133352,81	290,13	31210,3	443,07	434,99

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05  
g.l: Grados de libertad; I.C: Índice de cosecha.

Tabla 3.21. Comparación de los valores medios de 11 variables dependientes obtenidas en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno”, inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Rendimiento fresco (g planta <sup>-1</sup> )	Rendimiento seco (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Frutos/planta	Peso fresco medio por fruto (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Control 25% N	260,65a	11,59a	34,71a	0,29ab	2,29a	116,94a	142,28a	28,03a	131,75a	7,68a	9,63a
Control 100% N	412,04ab	21,24b	57,48b	0,34ab	2,92a	147,05a	311,01c	50,37b	270,93b	16,42b	18,78b
LET1910+SCFB 3-1 (25%N)	325,27a	15,44ab	42,33ab	0,33ab	2,27a	151,95ab	214,25abc	40,86ab	227,44ab	11,09ab	14,91ab
A+SCFB 3-1 (25%N)	421,25ab	16,16ab	50,03ab	0,28a	2,90a	154,84ab	189,32ab	34,11ab	198,076ab	8,66a	13,05ab
A+LET1910+SCFB 3-1 (25%N)	531,062b	22,29b	56,50b	0,36b	2,85a	187,52b	288,79bc	44,34ab	263,50b	15,39b	19,17b

I.C: Índice de cosecha.

Tabla 3.22. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para 11 variables dependientes, obtenidos en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles.

Contrastes	Valores medios de cada contraste	Código para los gráficos	Rendimiento fresco (g planta <sup>-1</sup> )	Rendimiento seco (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Frutos/planta	Peso fresco medio por fruto (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Fertilización reducida en nitrógeno vs. inoculados	Fertilización reducida en N	(-)N	260,65	11,59	34,71	0,29	2,29	116,94	142,28	28,03	131,75	7,68	9,63
	Inoculados	I	425,86	17,96	49,62	0,32	2,67	164,77	230,79	39,77	229,67	11,71	15,71
100 % fertilización nitrogenada vs. Inoculados	Fertilización con 100% N	N	412,04	21,24	57,48	0,34	2,92	147,05	311,01	50,37	270,93	16,42	18,78
	Inoculados	I	425,86	17,96	49,62	0,32	2,67	164,77	230,79	39,77	229,67	11,71	15,71
Inoculados con <i>R. leguminosarum</i> vs. inoculado sin <i>R. leguminosarum</i>	Inoculados con <i>R. leguminosarum</i>	Rh	428,17	18,86	49,41	0,34	2,56	169,73	251,52	42,60	245,47	13,24	17,04
	Inoculados sin <i>R. leguminosarum</i>	(-)Rh	421,25	16,16	50,03	0,28	2,90	154,84	189,32	34,11	198,08	8,66	13,05

I.C: Índice de cosecha.

Tabla 3.22. Valores medios de los contrastes ortogonales de tratamientos para 11 variables dependientes, obtenidos en el experimento de campo con pimiento morrón ecotipo “de Fresno” inoculada con tres biofertilizantes frente a dos controles. (Continuación)

Contrastes	Valores medios de cada contraste	Código para los gráficos	Rendimiento fresco (g planta <sup>-1</sup> )	Rendimiento seco (g planta <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	I.C	Frutos/planta	Peso fresco medio por fruto (g)	N en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	P en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	K en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Ca en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )	Mg en semillas (mg planta <sup>-1</sup> )
Inoculados con micorriza vs. inoculado sin micorriza	Inoculados con micorriza Inoculado sin micorriza	M (-)M	476,16 325,27	19,23 15,44	53,26 42,33	0,32 0,33	2,88 2,27	171,18 151,95	239,06 214,25	39,22 40,86	230,79 227,44	12,02 11,09	16,11 14,91
Inoculado con micorriza y <i>B. amyloliquefaciens</i> vs. inoculado con micorriza, <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Inoculado con micorriza y <i>B. amyloliquefaciens</i>	M+PGPR	421,25	16,16	50,03	0,28	2,90	154,84	189,32	34,11	198,08	8,66	13,05
	Inoculado con micorriza, <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	M+Rh+PGPR	531,06	22,29	56,50	0,36	2,85	187,52	288,79	44,34	263,50	15,39	19,17
Inoculado con <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> vs. inoculado con micorriza, <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Inoculado con <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Rh+PGPR	325,27	15,44	42,33	0,33	2,27	151,95	214,25	40,86	227,44	11,09	14,91
	Inoculado con micorriza, <i>R. leguminosarum</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	M+Rh+PGPR	531,06	22,29	56,50	0,36	2,85	187,52	288,79	44,34	263,50	15,39	19,17

Tabla 3.23. Valores relativos al pH, grados Brix, Grados Baumé y contenido de N, P, K, Ca y Mg en los pimientos, en el experimento de campo para comparar el efecto de tres biofertilizantes frente a dos controles.

Tratamiento	pH	Grados Brix	Escala Baumé	N (%)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)
LET1910 + SCFB3-1	5,08	6,60	3,73	1,78	3395,7	19142,8	919,7	1239,1
Control 25%N	5,01	6,93	3,93	1,80	3607,0	17154,3	942,8	1250,3
A + SCFB3-1	5,07	6,60	3,80	1,86	3317,3	18644,9	1027,4	1256,8
Control 100% N	5,00	7,07	4,07	1,98	3361,2	17902,9	1046,4	1245,6
A + LET1910 + SCFB3-1	5,07	6,67	3,80	2,03	3232,1	19016,5	1057,6	1360
Media cuadrática	0,004	0,137	0,053	0,038	58422,618	2090055,411	11949,898	7665,202
F	0,565 ns	0,090 ns	0,095 ns	2,369 ns	0,585 ns	0,677 ns	0,142 ns	0,674 ns

## 5 REFERENCIAS

- Andrade, G., de Leij, F., y Lynch, J. (1998). Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. Letters in Applied Microbiology, 26(4), 311-316.
- Andrade, G., Linderman, R., y Bethlenfalvay, G. (1998). Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *glomus mosseae*. Plant and Soil, 202(1), 79-87.
- Antunes, P. M., de Verennes, A., Rajcan, I., y Goss, M. J. (2006). Accumulation of specific flavonoids in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as a function of the early tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan. Soil Biology and Biochemistry, 38, 1234-1242.
- Artursson V. 2005. Bacterial–fungal interactions highlighted using microbiomics: potential application for plant growth enhancement. Ph.D. Thesis. Uppsala, Sweden. University of Uppsala,
- Barea, J., Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (2004). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. En: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., y

- Hampp, R. (eds). Plant surface microbiology. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany.
- Barea, J., Pozo, M. J., Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A., y Mañero, F. J. G. (2008). Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). En: Ahmad, I., Pichtel, J., y Hayat, S. (eds). Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth. Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim.
- Burdman, S., Volpin, H., Kigel, J., Kapulnik, Y., y Okon, Y. (1996). Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 3030-3033.
- Camacho, M., Santamaria, C., Temprano, F., Rodriguez-Navarro, D., y Daza, A. (2001). Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(11), 1058-1062.
- Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., y Jurkevitch, E. (2007). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), 1-11.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., y Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48(5), 489-499.
- Cosme, M., y Wurst, S. (2013). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobacteria, soil phosphorus and plant cytokinin deficiency change the root morphology, yield and quality of tobacco. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 436-443.
- Del Amor, F., Serrano-Martínez, A., Fortea, M., Legua, P., y Núñez-Delicado, E. (2008). The effect of plant-associative bacteria (*Azospirillum* and *Pantoea*) on the fruit quality of sweet pepper under limited nitrogen supply. *Scientia Horticulturae*, 117(3), 191-196.
- del Val, C., Barea, J., y Azcón-Aguilar, C. (1999). Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 11(2), 261-269.

- Díaz-Alcántara, C. A. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Ph. D. Thesis. León, España. Universidad de León. 121 p.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., y Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2), 107-149.
- Edwards, S. G., Young, J. P. W., y Fitter, A. H. (1998). Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 166(2), 297-303.
- Estrada, B., Aroca, R., Maathuis, F. J. M., Barea, J. M., y Ruiz-Lozano, J. M. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi native from a mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. *Plant, Cell y Environment*, 36(10), 1771-1782.
- Fernández Bidondo, L., Bompadre, J., Pergola, M., Silvani, V., Colombo, R., Bracamonte, F., y Godeas, A. (2012). Differential interaction between two *Glomus intraradices* strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize rhizosphere. *Pedobiologia*, 55(4), 227-232.
- Fisher, R. A., y Yates, F. (1949). *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fox, S. L., O'Hara, G. W., y Bräu, L. (2011). Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant and Soil*, 348(1-2), 245-254.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. A., y Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176(1), 22-36.
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M. G., y Berta, G. (2004). Impact of two fluorescent *Pseudomonads* and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza*, 14(3), 185-192.
- Garbaye, J. (1994). Tansley review no. 76 helper bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128(2), 197-210.
- Geneva, M., Zehirov, G., Djonova, E., Kaloyanova, N., Georgiev, G., y Stancheva, I. (2006). The effect of inoculation of pea plants with mycorrhizal fungi and

- Rhizobium* on nitrogen and phosphorus assimilation. *Plant Soil and Environment*, 52(10), 435.
- Gerdemann, J., y Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235-244.
- Gianinazzi, S. (2002). *Mycorrhizal technology in agriculture: From genes to bioproducts*. Springer. Basel.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M., van Tuinen, D., Redecker, D., y Wipf, D. (2010). Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.
- Glick, B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012, 1-15.
- Gryndler, M. (2000). Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. En: Kapulnik, Y; Douds, D. D. J. (eds). *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. Kluwer academic publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Del Papa, M. F., Pistorio, M., y Rosas, S. B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils*, 46(2), 185-190.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., y Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- Hungria, M., y Vargas, M. A. (2000). Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2), 151-164.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., y Barea, J. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37(1), 1-16.
- Kaschuk, G., Kuyper, T. W., Leffelaar, P. A., Hungria, M., y Giller, K. E. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1233-1244.
- Kim, K., Yim, W., Trivedi, P., Madhaiyan, M., Boruah, H. P. D., Islam, M. R., . . . Sa, T. (2010). Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi

and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*, 327(1-2), 429-440.

- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., y Roldan, A. (2007). Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*, 35(3), 480-487.
- Koske, R. E., y Tessier, B. (1983). A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycol. Soc. Am. Newsl.*, 34, 59.
- Koske, R., y Gemma, J. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, 92(4), 486-488.
- Kumar, B. D., Berggren, I., y Mårtensson, A. (2001). Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 229(1), 25-34.
- Lee, J., Lee, S., y Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 339-349.
- Medina, A., Probanza, A., Gutierrez Mañero, F., y Azcón, R. (2003). Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Applied Soil Ecology*, 22(1), 15-28.
- Meyer, J. R., y Linderman, R. G. (1986). Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(2), 185-190.
- Miransari, M. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 917-930.
- Mortimer, P. E., Pérez-Fernández, M. A., y Valentine, A. J. (2008). The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1019-1027.
- Mulas, D., Díaz-Alcántara, C., Mulas, R., Marcano, I., Barquero, M., Serrano, P., y González-Andrés, F. (2013). Inoculants based in autochthonous microorganisms, a strategy to optimize agronomic performance of biofertilizers. En: González-López, J. (ed). *Beneficial Plant-Microbial Interactions*, CRC Press.

- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M., Casquero, P., Velázquez, E., y González-Andrés, F. (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(11).
- Mulas, D. 2010. Caracterización y selección de rizobios que nodulan alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) en la I.G.P. "Alubia de La Bañeza – León". Ph. D. Thesis. León, España. Universidad de León. 221 p.
- Nevens, F., y Reheul, D. (2003). The application of vegetable, fruit and garden waste (VFG) compost in addition to cattle slurry in a silage maize monoculture: Nitrogen availability and use. *European Journal of Agronomy*, 19(2), 189-203.
- Nishijima, F., Evans, W. R., y Vesper, S. J. (1988). Enhanced nodulation of soybean by *Bradyrhizobium* in the presence of *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil*, 111(1), 149-150.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., y Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127-133.
- Picard, C., y Bosco, M. (2008). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften*, 95(1), 1-16.
- Ramos-Solano, B., García, J. A. L., Garcia-Villaraco, A., Algar, E., Garcia-Cristobal, J., y Mañero, F. J. G. (2010). Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Soil*, 334(1-2), 189-197.
- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernández, G., García, A., y Reyes, J. L. (2008). Effect of *Rhizobium*-*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and Soil*, 312, 25-37.
- Rigaud, J., y Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacterioids. *Journal of General Microbiology*, 88, 223-228.

- Rosso, F., Zoppellari, F., Sala, G., Bergesio, B., Malusa, E., y Bardi, L. (2010). Effect of rhizospheric microorganisms inoculum on sweet pepper quality. *Journal of Biotechnology*, 1505.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., . . . Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514-525.
- Kormanik, P. P., McGraw, A-C. (1982). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. En: Schenck, N.C. (ed). American Phytopathol Society. St Paul, Minnesota.
- Schüßler, A., y C. Walker, C. (2010). The Glomeromycota: a species list with new families. En: <<http://www.amf-phylogeny.com>>. Revisado el 6 de febrero de 2014.
- Schultze, M., y Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*, 32(1), 33-57.
- Smith, K. P., y Goodman, R. M. (1999). Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 37(1), 473-491.
- Smith, S. E., y Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Elsevier. London, U.K.
- Srinivasan, M., Holl, F., y Petersen, D. (1996). Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(10), 1006-1014.
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., y Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, 356(1-2), 35-49.
- Tian, Y., Lei, Y., Zheng, Y., y Cai, Z. (2013). Synergistic effect of colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves growth and drought tolerance of *Plukenetia volubilis* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 687-696.
- Toljander, J. F., Artursson, V., Paul, L. R., Jansson, J. K., y Finlay, R. D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 34-40.

- Urbano-Terrón, P. (2002). Fitotecnia. ingeniería de la producción vegetal. Ediciones mundi-prensa. Madrid, España.
- Valdenegro, M., Barea, J., y Azcón, R. (2001). Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean area. *Plant Growth Regulation*, 34(2), 233-240.
- Van Veen, J., Van Overbeek, L., y Van Elsas, J. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 121-135.
- Vázquez, M. M., César, S., Azcón, R., y Barea, J. M. (2000). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population. *Applied Soil Ecology* 15, 261-272.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., y Kumar, A. (2013). Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering*, 51, 282-286.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- Wu, Q., Zou, Y., y He, X. (2010). Contributions of arbuscular mycorrhizal fungi to growth, photosynthesis, root morphology and ionic balance of citrus seedlings under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(2), 297-304.
- Xie, Z. P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Boller, T. (1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiology*, 108(4), 1519-1525.

**BIOCONTROL**



## 1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos causan un grave impacto en la salud de las plantas y son responsables de enfermedades que ocasionan pérdidas anuales en los cultivos por más de 200 billones de euros (Agrios, 2005). Para su control, se utilizan productos químicos que elevan los costos de producción y causan diversos efectos negativos en el ambiente, como desarrollo de resistencia en patógenos o contaminación de suelos y mantos acuíferos. Entre tanto, la creciente demanda de productos orgánicos o libres de pesticidas constituye una razón más para la búsqueda de estrategias y nuevos productos para el control de enfermedades, y en este sentido el biocontrol se presenta como una vía alternativa (Gerhardson, 2002).

Existen bacterias que gracias al biocontrol que ejercen sobre los microorganismos fitopatógenos que se encuentran en la rizosfera, promueven de forma indirecta el crecimiento de la planta hospedadora, ya sea evitando el ataque de los patógenos o induciendo resistencia en la planta. Por consiguiente, una misma cepa puede funcionar como biocontroladora y promotora de crecimiento al mismo tiempo (Kloeppe et al., 1999).

Los mecanismos que utilizan las bacterias biocontroladoras se consideran mecanismos indirectos de promoción del crecimiento (Glick, 2012). La producción de antibióticos, enzimas líticas, sideróforos y de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa; la competencia y la resistencia sistémica inducida, son todos mecanismos indirectos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento o PGPR. (Compant et al., 2005; Glick, 2012). Por otra parte, esta acción promotora de crecimiento podría favorecer indirectamente al biocontrol, debido a la disminución de estados susceptibles de la planta como mala nutrición y al fortalecimiento de etapas tempranas del crecimiento vegetal, fundamentalmente semillas y plántulas, en donde el ataque de patógenos de suelo es común y la nutrición de la planta es decisiva en el combate de las enfermedades (Kloeppe et al., 1999).

Las PGPR pueden utilizar uno o varios de estos mecanismos de acción y existen numerosos estudios al respecto. Algunas razas de *Pseudomonas*, importantes en el control de hongos patógenos, presentan una colonización agresiva de raíces, inducción de resistencia sistémica en la planta y producción de antibióticos (Haas & Keel, 2003). En varias especies de *Bacillus* se han encontrado familias de lipopéptidos que muestran actividad antagonista contra hongos, bacterias y oomicetes; influyen la colonización de raíces y juegan un papel importante en la estimulación de defensa en la planta (Ongena y Jacques, 2008).

Otro grupo de microorganismos utilizados en biocontrol son los hongos AM. La relación simbiótica que establecen con las raíces de las plantas formando micorrizas arbusculares, puede encontrarse en prácticamente todos los ecosistemas. La acción biocontroladora de las micorrizas arbusculares obedece a la interacción de diferentes mecanismos, tales como el mejoramiento de la nutrición de la planta, la competición con los patógenos por la fotosíntesis del hospedador y la colonización de sus raíces, cambios en la anatomía y arquitectura del sistema radical, cambios en la población microbiana de la rizosfera y activación de mecanismos de defensa en la planta (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Azcón-Aguilar et al., 2002). Múltiples investigaciones indican su efectividad contra nematodos (Calvet et al., 2001), oomicetes y hongos de suelo como *Phytophthora* (Vigo et al., 2000), *Pythium* (Larsen et al., 2012), *Fusarium* (Akköprü y Demir, 2005), *Rhizoctonia* (Yao et al., 2002) y *Armillaria* (Nogales et al., 2009).

Además de la capacidad de fijar nitrógeno, los rizobios, al igual que las rizobacterias y los hongos AM, también poseen la capacidad de controlar diversos patógenos de suelo. Al respecto, se han obtenido resultados interesantes en el control de *Macrophomina* en cacahuete (Arora et al., 2001) y de *Pythium* en guisantes y remolacha azucarera (Bardin et al., 2004).

La interacción natural presente entre las poblaciones de estos microorganismos habitantes del suelo ha llevado consecuentemente a la ejecución de estudios de coinoculación en distintos cultivos y contra diferentes patógenos. Se han coinoculado mezclas de PGPR como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter* para el control de enfermedades fúngicas. Raupach y Kloepper (1998), utilizaron mezclas de PGPR para el control de *Colletotrichum*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia* en pepino. Saravanakumar et al. (2009) también utilizaron mezclas de *Pseudomonas* que indujeron resistencia en arroz contra el hongo *Sarocladium oryzae*, causante de la pudrición de la vaina y Recep et al. (2009) probaron 17 cepas de PGPR, entre ellas *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, contra la pudrición seca de la patata causada por varias especies de *Fusarium*. Por otra parte, Dutta et al. (2008) encontraron que la inoculación de *Pseudomonas* y *Rhizobium* indujo resistencia sistémica contra la marchitez por *Fusarium* en guandul y Sayeed Akhtar y Siddiqui (2008) obtuvieron resultados exitosos en el control de la pudrición de raíz en garbanzo causado por el nematodo *Meloidogyne incognita* y el hongo *Macrophomina phaseolina*, inoculando *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. y *Pseudomonas*. Estas investigaciones demuestran la interacción que existe entre hongos AM, PGPR y rizobios y el papel que juegan en la protección de las plantas contra patógenos.

*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* y *Phytophthora cactysici* son patógenos de suelo que afectan a alubia y pimiento respectivamente. *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr.

f.sp. *phaseoli* J.B. Kendrichy W.C. Zinder, es el agente causal de la marchitez por Fusarium de la alubia (*P. vulgaris* L.) y en España es la enfermedad más importante que afecta la productividad de la alubia en la región de Castilla y León (Díaz-Mínguez et al., 1996). Por su parte, la marchitez del pimiento (*C. annuum* L.), es causada por el oomicete *P. capsici*, una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial (Ristaino y Johnston, 1999). El control químico y las prácticas agrícolas son estrategias utilizadas en el control de ambas enfermedades, no obstante, los efectos nocivos de los agroquímicos ha conducido a la búsqueda de microorganismos para su uso como controladores biológicos y la exploración de suelos para la selección de bacterias antagonistas es una de las metodologías comúnmente utilizadas (Chang et al., 2001; Rajkumar et al., 2005; Kim et al., 2008). Al respecto, *G. intraradices* y *Bacillus*, entre otros, han mostrado capacidad como agentes biocontroladores de *F. oxysporum* y *P. capsici* en alubia y pimiento (Filion et al., 2003; Jiang et al., 2006).

## 2 OBJETIVO

El objetivo de esta investigación consistió en la búsqueda de microorganismos eficaces para el biocontrol de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* en alubia y *P. capsici* en pimiento.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Bacterias, hongos y material vegetal utilizado

Las bacterias endofíticas utilizadas en los ensayos, fueron aisladas según se describe en el capítulo de Biodiversidad del presente trabajo. Los ensayos en planta se hicieron con plantas de alubia variedad Riñón y de pimiento morrón ecotipo “de Fresno”. La cepa de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, FOP-SP1 (Alves-Santos et al., 1999), fue donada por el Dr. José María Díaz-Mínguez del Centro Hispanoluso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca y la cepa de *P. capsici* por el Dr. Julio Tello Marquina de la Universidad de Almería.

### 3.2 Pruebas *in vitro*: enfrentamientos duales

Las cepas bacterianas aisladas de raíces de pimiento y alubia se analizaron para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, patógeno radicular en alubia y *P. capsici*, patógeno radicular en pimiento. Se

utilizó el procedimiento de Landa et al. (2001) con algunas modificaciones. En placas Petri con medio patata dextrosa agar (PDA) se puso en el centro un disco de agar, tomado de la zona de crecimiento (borde) de un cultivo puro de ocho días del hongo correspondiente, crecido en PDA y dos cepas bacterianas diferentes a cada lado del disco, separadas 1 cm del borde de la placa (Figura 4.1). Estas bacterias provenían de cultivos puros de tres días en medio “triptic soy agar” (TSA). Se hicieron tres repeticiones de cada placa. Las placas se incubaron a 28 °C durante una semana. Se midió el halo de inhibición presente entre el hongo y cada bacteria.

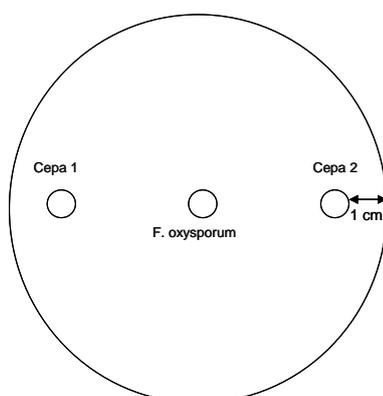


Figura 4.1. Esquema del diseño de los ensayos de enfrentamientos duales del cultivo de *F. oxysporum* o *P. capsici* vs cepas bacterianas, en condiciones *in vitro*.

### 3.3 Pruebas *in vivo*

Las cepas de bacterias endofíticas que produjeron un halo de inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* o *P. capsici* en placas de Petri (pruebas *in vitro*), se inocularon junto con el hongo en la respectiva planta hospedera: alubia o pimiento.

Los ensayos se establecieron en cámaras de crecimiento con fotoperíodo y temperatura regulados: 16 horas de luz a 24 °C, ocho horas de oscuridad a 18 °C y humedad relativa del 65%. El sustrato utilizado fue vermiculita exfoliada (Verlite, España) empapada previamente en agua destilada y esterilizada en autoclave en bolsas de polipropileno (Sterilin, Reino Unido) durante 50 minutos a 121°C. Los riegos se hicieron con agua destilada esterilizada en autoclave durante 50 minutos a 121 °C y con la solución nutritiva (Rigaud y Puppo, 1975) (Tabla 3.1, capítulo anterior) con nitrógeno a una concentración de 1,6 g l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Los cultivos puros de las bacterias endofíticas utilizados en la preparación de las soluciones salinas bacterianas, provenían de placas con medio de cultivo TSA, incubadas a 28 °C durante tres días. En todos los ensayos, se incluyó un control

negativo que contenía solamente solución salina al 0,9% y un control positivo con solución salina y el hongo patógeno correspondiente.

El secado de partes aéreas y de la raíz se realizó en estufa a 70 °C durante 72 horas. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza, luego de comprobar la significancia de la varianza se procedió a realizar pruebas de comparaciones múltiples de medias (Tukey). Este análisis estadístico se hizo utilizando el programa SPSS.

### 3.3.1 Inoculación en plantas de alubia

Se inocularon 15 bacterias (Tabla 4.1), un control positivo y uno negativo, cada tratamiento se inoculó en ocho plantas.

Las semillas de alubia se desinfectaron (etanol al 70% durante un minuto, siete minutos con hipoclorito de sodio al 5% y finalmente tres lavados con agua destilada estéril) y se sembraron en bandejas de aluminio de 30 x 24 cm con vermiculita. Para cada bacteria se sembraron 20 semillas por bandeja y cada semilla se inoculó con 2 ml de la solución bacteriana a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Los controles positivos y negativos se inocularon con solución salina. Una semana después las plántulas de alubia se trasplantaron a macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> con vermiculita y se inocularon con *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. La inoculación de la alubia se hizo como se describió previamente por (Alves-Santos et al. (1999). Se tomaron ocho plantas de cada bandeja (inoculada con una misma bacteria) y las raíces se lavaron con agua estéril. Sin mezclar plantas provenientes de diferentes bandejas, se sumergieron durante cinco minutos en 20 ml de una suspensión de esporas de  $1 \times 10^6$  esporas ml<sup>-1</sup> de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. El hongo se cultivó en PDA a 28 °C en condiciones de luz fluorescente continua durante ocho días. Una vez inoculadas las plantas con el patógeno, se sembraron en las macetas y se inocularon por segunda vez con las bacterias (2 ml por planta,  $9 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>), los controles negativo y positivo se volvieron a inocular con solución salina. Las plantas se regaron semanalmente con 250 ml de agua destilada estéril y cada 15 días el riego se hizo con la solución nutritiva Rigaud y Puppo suplementada con nitrógeno. Se evaluó la severidad a los 15 días de la inoculación con el patógeno, según la escala utilizada por el centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Pastor Corrales, 1987). Se obtuvo además el peso seco y peso fresco de la parte aérea de la planta y el peso seco de la raíz.

Tabla 4.1. Cepas bacterianas endofíticas inoculadas in vivo en plantas de alubia variedad Riñón para determinar su efecto biocontrolador sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Tratamiento: cepa bacteriana	Identificación
RVSV 1-5	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
VCC 3-3	<i>P. thivervalensis</i>
RVSV 1-2	<i>P. thivervalensis</i>
VCV 3-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
MTA 1-3	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
RVPA 1-4	<i>B. siamensis</i>
MTA 1-2	<i>B. pumilus</i>
SCE 3-4	<i>P. geniculata</i>
MMM 3-4	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
RVSV 1-3	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
SCFB 3-4	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
SCFB 3-1	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
SCFB 2-2	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
RVPB 2-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
SCFA 1-2	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>

### 3.3.2 Inoculación en plantas de pimiento

Se utilizaron 13 bacterias, descritas en la Tabla 4.2. Cada bacteria y los controles negativo y positivo se inocularon en ocho plantas de pimiento.

Las semillas de pimiento sembradas en medio agar agua (AA), se desinfectaron con etanol al 70% un minuto, hipoclorito de sodio al 2% cinco minutos y tres lavados con agua destilada estéril. Al cuarto día de la siembra se trasplantaron las semillas a alveolos (28 x 28 x 45 mm) con vermiculita y tres semanas después a macetas de 1000 cm<sup>3</sup> con vermiculita lavada estéril. Al cabo de las tres semanas las plantas se inocularon con las bacterias. Se inoculó 25 ml de solución bacteriana por planta a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> en la base de cada planta sin tocarla. Una semana después cada planta se inoculó con 1 ml de zoosporas de *P. capsici* ( $1,5 \times 10^5$  zoosporas ml<sup>-1</sup>) (Kim et al., 2008). Para obtener zoosporas del hongo, se utilizó el procedimiento descrito por (Kim et al., 1997). El hongo se puso a crecer en agar avena por siete días a 28 °C, luego de este tiempo se añadió a cada placa 15 ml de agua destilada estéril y se incubó otros siete días bajo condiciones de luz fluorescente continua a 28 °C para favorecer la formación de zoosporangios. Para inducir la liberación de las zoosporas se inundó con 10 ml de agua destilada estéril fría cada placa, se mantuvo 30 minutos a 4 °C y luego 30 minutos a temperatura

ambiente. Se raspó la placa, se recogió el líquido y se agitó; luego se filtró mediante tres capas de gasa estéril con el objetivo de eliminar restos de micelio y esporangios. Las zoosporas se contaron con ayuda del hemacitómetro.

Las plantas se regaron semanalmente con 250 ml de agua destilada estéril y cada 15 días el riego se hizo con la solución nutritiva Rigaud y Puppo suplementada con nitrógeno. Se evaluó la severidad a los 15 días de la inoculación con el patógeno, según la escala utilizada por Kingkun et al. (1989).

Tabla 4.2. Cepas bacterianas endofíticas inoculadas *in vivo* en plantas de pimiento morrón ecotipo “de Fresno” para determinar su efecto biocontrolador sobre *P. capsici*.

Tratamiento: cepa bacteriana	Identificación
SCFC 2-2	<i>B. anthracis</i>
VCC 3-3	<i>P. thivervalensis</i>
RVSV 1-5	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
VCV 3-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
RVSV 1-3	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
FVA 2-3	<i>B. toyonensis/thuringiensis</i>
RVPB 2-2	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i>
MMM 2-1	<i>B. pumilus</i>
FVA 1-5	<i>B. pumilus</i>
BLQ 3-2	<i>B. pumilus</i>
RVSV 1-2	<i>P. thivervalensis</i>
PPSA 2-3	<i>B. pumilus</i>
SCFC 1-2	<i>B. pumilus</i>

### 3.4 Pruebas en Invernadero: microcosmos

Se analizó el efecto biocontrolador de combinaciones binarias de microorganismos rizosféricos sobre *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* y *P. capsici* en plantas de alubia y pimiento en invernadero.

Se utilizaron dos inóculos de AM hongos autóctonos, cepas A y F, aislados y producidos en el laboratorio; el rizobio LET1910, productor de IAA y sideróforos y parte de la colección del grupo de investigación (Mulas et al., 2011); y las cepas bacterianas endofíticas que mejor controlaron a los patógenos en los ensayos en planta.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero en macetas de 4.000 cm<sup>3</sup>. Como sustrato se utilizó una mezcla en proporción 4:1 (v:v), de suelo con vermiculita exfoliada (Verlite, España). El suelo se extrajo de fincas productoras de alubia de Sueros de Cepeda, para los ensayos con alubia y de fincas productoras de pimiento morrón de Fresno de la Vega, para los ensayos con pimiento. Ambas fincas pertenecientes a la IGP “Alubia de la Bañeza-León” y “Pimiento de Fresno-Benavente”, ubicadas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, España.

Las plantas se regaron según requerimientos hídricos para mantener el suelo a capacidad de campo. Se realizaron análisis de nutrientes de ambos suelos. Las plantas se abonaron con N, P, K. El cálculo del abonado con P y K se realizó teniendo en cuenta la riqueza del suelo en estos dos macronutrientes y el procedimiento de cálculo propuesto por Urbano-Terrón (2002). En cuanto a la fertilización con nitrógeno, se aportaron las extracciones esperadas de nitrógeno según Urbano-Terrón (2002) hasta el momento de la floración.

Las condiciones de crecimiento de las plantas en cámara de crecimiento fueron las mismas descritas en la sección de pruebas *in vivo*.

Los cultivos puros de las bacterias endofíticas utilizados en la preparación de las soluciones salinas bacterianas, provenían de placas con medio de cultivo triptic soy agar (TSA), incubadas a 28 °C durante tres días. El rizobio utilizado (LET1910) en las inoculaciones provenía de placas con medio de cultivo YMA de cinco días a 28 °C.

El secado de partes aéreas se realizó en estufa a 70 °C durante 72 horas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA con el paquete estadístico SPSS.

### 3.4.1 Inoculación en plantas de alubia

Se escogieron las dos cepas de bacterias endofíticas que mejor controlaron a *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* en plantas de alubia en los ensayos in vivo, RVPB 2-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca*) y SCFA 1-2 (*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*). Se probaron junto con los dos inóculos de hongos micorrícicos y el rizobio LET1910. Se utilizaron dos controles, uno positivo inoculado solamente con el patógeno y otro negativo sin inocular. Los tratamientos se detallan en la tabla 4.3.

El diseño experimental consistió en Bloques Completos al Azar, con tres bloques. Hubo ocho tratamientos y dos controles. Cada unidad experimental estuvo constituida por cuatro macetas con una planta por maceta.

Las semillas de alubia se desinfectaron según se detalló anteriormente y se sembraron en bandejas de aluminio de 30 x 24 cm con vermiculada lavada estéril. Las semillas se inocularon con la solución bacteriana correspondiente según el tratamiento. Cada semilla se inoculó con 2 ml de la solución bacteriana a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Los controles positivos y negativos se inocularon con solución salina al 0,9%. Los tratamientos compuestos por una bacteria endofítica y el rizobio se inocularon con 1 ml de la suspensión de cada cepa. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento.

Una semana después se realizó el trasplante a invernadero. Las plántulas se trasplantaron a las macetas y se inocularon con *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. La inoculación de la alubia se hizo como se describió previamente por Alves-Santos et al. (1999). Se tomaron las plantas de cada bandeja (inoculada con una misma bacteria o mezcla de bacterias), sin mezclar plantas provenientes de diferentes bandejas, y con un bisturí se cortaron las puntas de las raíces e inmediatamente se sumergieron durante cinco minutos en 20 ml de una suspensión de esporas de  $1 \times 10^6$  esporas ml<sup>-1</sup> de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. El hongo se cultivó en PDA a 28 °C en condiciones de luz fluorescente continua durante ocho días. Una vez inoculadas las plantas con el patógeno, se sembraron en las macetas y se inocularon por segunda vez con las bacterias, se pusieron 8 ml/planta a una concentración de  $9 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>; en los tratamientos compuestos, se inocularon 4 ml de cada cepa. Al mismo tiempo, se realizó la inoculación de los tratamientos correspondientes con los hongos AM. Se pusieron 10 g de arena, que contenía el inóculo, por maceta antes de sembrar la planta. La inoculación de las bacterias se hizo directamente sobre la raíz. Los controles negativo y positivo se volvieron a inocular con solución salina. Las plantas se mantuvieron en invernadero y se evaluó la severidad a los 20 días de la inoculación con el patógeno, según la escala utilizada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Pastor Corrales, 1987). Se obtuvo además el peso fresco y peso seco de la parte aérea de la planta.

### 3.4.2 Inoculación en plantas de pimiento

Al igual que en el ensayo con alubia se utilizaron las dos mejores cepas de bacterias endófitas que controlaron a *P. capsici* en plantas de pimiento en los ensayos en cámaras de cultivo, SCFC 1-2 (*B. pumilus*) y PPSA 2-3 (*B. pumilus*), junto con los demás microorganismos. Se utilizaron tres controles, uno positivo inoculado solamente con el hongo patógeno, otro inoculado con el hongo patógeno tratado con fungicida y un tercero sin inocular (control negativo) (Tabla 4.3).

El diseño experimental consistió en Bloques Completos al Azar con tres bloques. Hubo ocho tratamientos y tres controles. Cada unidad experimental estuvo constituida por cuatro macetas con una planta por maceta.

Se sembraron semillas de pimiento en medio AA desinfectadas según el procedimiento descrito en secciones anteriores. Al cuarto día de la siembra, las semillas germinadas se sembraron en alveolos (28 x 28 x 45 mm) con vermiculita lavada estéril y se mantuvieron en cámara de crecimiento. Al cabo de tres semanas las plántulas se trasplantaron a las macetas y se inocularon con las bacterias y hongos micorrícicos. Cada planta se inoculó con 12,5 ml de solución bacteriana en solución salina (al 0,9%) a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Los tratamientos compuestos por bacteria endofítica y rizobio se inocularon con 6,25 ml de cada uno y los que llevaban hongos micorrícicos con 10 g del inóculo de hongo AM antes de la siembra de la plántula. Las inoculaciones bacterianas se hicieron directamente sobre la raíz. Una semana después se realizó una segunda inoculación con las bacterias endofíticas y el rizobio. Se inocularon en la base de la planta sin tocarla y se aplicaron las mismas dosis que en la primera inoculación. Los controles negativo y positivo se inocularon solo con solución salina al 0,9%. Al control con fungicida se aplicó 0,08 ml/planta (se llevó a 3 ml con agua) del fungicida Previcur® Energy de Bayer, al día siguiente de la segunda inoculación. Una semana después de esta inoculación, se infectaron las plantas con el patógeno; se inocularon 5 ml de zoosporas de *P. capsici* ( $1 \times 10^4$  zoosporas ml<sup>-1</sup>) por planta. Para la obtención de zoosporas del hongo, se utilizó el procedimiento descrito por Kim et al. (1997) explicado anteriormente.

Las plantas se mantuvieron en invernadero. Se evaluó la severidad a las cuatro semanas de la inoculación con el patógeno, según la escala utilizada por Kingkun et al. (1989) y Koske y Gemma, (1989). Se obtuvo además el peso fresco y peso seco de la parte aérea de la planta.

Tabla 4.3. Tratamientos de los ensayos de biocontrol de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* en alubia y *P. capsici* en pimiento en invernadero.

Tratamientos	
Alubia	Pimiento
RVPB 2-2* + A**	SCFC 1-2* + A
RVPB 2-2 + F**	SCFC 1-2 + F
SCFA 1-2* + A	PPSA 2-3* + A
SCFA 1-2 + F	PPSA 2-3 + F
LET1910*** + RVPB 2-2	LET1910 + SCFC 1-2
LET1910 + SCFA 1-2	LET1910 + PPSA 2-3
LET1910 + A	LET1910 + A
LET1910 + F	LET1910 + F
Control Positivo	Control Positivo
Control Negativo	Control con Fungicida
	Control Negativo

\*Bacterias endofíticas  
 \*\*AM Hongos  
 \*\*\*Rizobio

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Pruebas *in vitro*: enfrentamientos duales

Los resultados de los enfrentamientos duales entre patógenos de suelo y cepas bacterianas endofíticas aisladas de raíces se resumen en la tabla 4.4. Se obtuvieron 23 cepas bacterianas que mostraron capacidad de biocontrol mediante inhibición de crecimiento en las pruebas *in vitro* (figura 4.2); 16 de ellas controlaron a *Fusarium* y 13 controlaron a *Phytophthora*. Según se aprecia en la tabla 4.2, las cuatro cepas que produjeron mayores halos de inhibición de crecimiento, tanto en *Fusarium* como en *Phytophthora*, pertenecieron al género *Pseudomonas*, concretamente *P. brassicaceanum* y *P. thivervalensis*. Estas cepas procedían de raíces de plantas de alubia, provenientes de fincas localizadas en un mismo municipio, Riego de la Vega, provincia de León. El resto de las cepas aisladas y evaluadas (199) no mostró ninguna acción inhibitoria de crecimiento en los enfrentamientos duales.

Biocontrol

Tabla 4.4. Cepas bacterianas que produjeron un halo de inhibición del crecimiento en *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* y *P. capsici* en cultivo *in vitro*. Valores medios de tres mediciones del halo de inhibición.

Código de la cepa	Cultivo de procedencia	Identificación de la cepa	Halo de inhibición (mm)	
			<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	<i>P. capsici</i>
RVSV 1-5	A*	<i>P. brassicaceanum</i>	12,67	12,33
RVSV 1-3	A	<i>P. brassicaceanum</i>	12,00	11,33
RVSV 1-2	A	<i>P. thivervalensis</i>	10,33	12,00
RVPB 2-2	A	<i>P. brassicaceanum</i>	6,00	11,00
MTA 1-2	P**	<i>B. pumilus</i>	5,00	0
VCC 3-3	A	<i>P. thivervalensis</i>	4,00	8,67
SCFB 2-2	P	<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,00	0
RVPA 1-4	A	<i>B. methylotrophicus</i>	3,67	0
SCFB 3-4	P	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,67	0
VCV 3-2	A	<i>P. thivervalensis</i>	3,33	9,33
MTA 1-3	P	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,33	0
SCFB 3-1	P	<i>B. amyloliquefaciens</i>	2,33	0
SCE 3-4	P	<i>P. geniculata</i>	2,00	0
SCE 3-4	P	<i>P. geniculata</i>	2,00	0
SCFC 2-2	P	<i>B. cereus</i>	0	2,33
SCFC 1-2	P	<i>B. pumilus</i>	0	1,00
FVA 2-3	P	<i>B. thuringiensis</i>	0	1,00
FVA 1-5	P	<i>B. pumilus</i>	0	2,33

\*Alubia

\*\*Pimiento

El tamaño de los halos varió ente 12,67 mm y 1 mm. Algunas cepas inhibieron el crecimiento de ambos patógenas, entre ellas las cuatro mejores, mientras que otras solo inhibieron el crecimiento de uno de los hongos patógenos. Las cepas biocontroladoras pertenecen a especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*,

microorganismos que comúnmente se utilizan como antagonistas para el control de enfermedades causadas principalmente por hongos fitopatógenos (Lugtenberg et al., 2013).

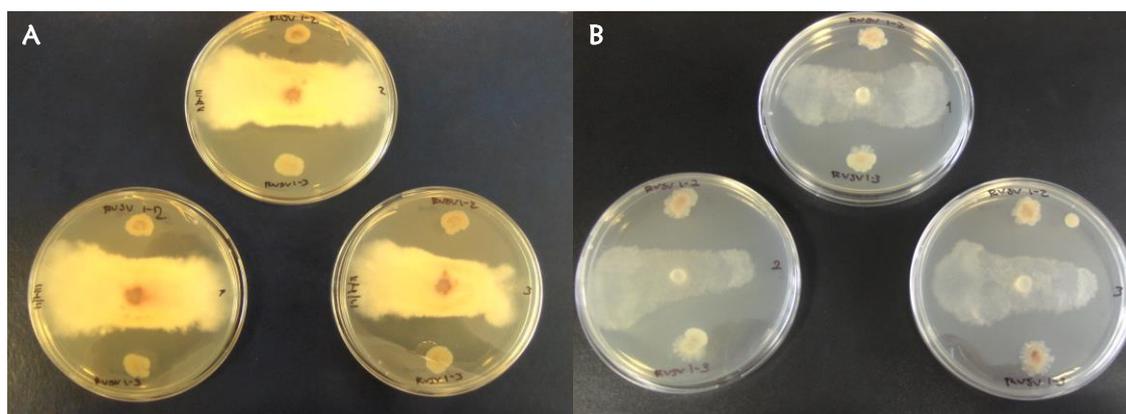


Figura 4.2. Enfrentamientos duales en medio PDA, pruebas de biocontrol *in vitro*. A. Halo de inhibición en *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*. B. Halo de inhibición en *P. capsici*.

## 4.2 Pruebas in vivo

### 4.2.1 Inoculación en plantas de alubia

En la tabla 4.5, se muestran los resultados de la inoculación en plantas de alubia en condiciones gnotobióticas de las cepas bacterianas que mostraron actividad biocontroladora en los ensayos *in vitro*. Las cepas que produjeron los mejores resultados en la producción de biomasa aérea (fresca y seca) y que además presentaron valores bajos en la escala de severidad del ataque fúngico, fueron la RVPB 2-2 (*P. brassicacearum*) y la SCFA 1-2 (*B. siamensis*) (figura 4.3). Las plantas inoculadas con esta última cepa, mostraron un crecimiento aéreo incluso mayor que el tratamiento control que no se inoculó con el patógeno, aunque esta diferencia no fue significativa. Si bien no se ha probado la acción biocontroladora de esta especie contra *Fusarium* ya que se trata de una especie descrita recientemente, Jeong et al. (2012) encontraron que inhibía significativamente el crecimiento micelial de los hongos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*.

*B. siamensis* se encuentra dentro del grupo taxonómico al que pertenece *B. amyloliquefaciens* (Jeong et al., 2012; Kim et al., 2012), y aunque como se apuntó anteriormente, no se han realizado estudios de biocontrol de *B. siamensis* contra *Fusarium*, la acción biocontroladora de *B. amyloliquefaciens* contra *Fusarium* (Dunlap et al., 2013; Khan et al., 2001) y otros patógenos como hongos poscosecha en cítricos (Arrebola et al., 2010) o *Colletotrichum* (Kim y Chung, 2004) sí se ha comprobado. Incluso esta bacteria se ha comercializado como biofungicida contra *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Fravel, 2005).

Por su parte, en el caso de *P. brassicacearum*, la acción como agente biocontrolador de este género es bien conocida (Weller, 2007). *P. brassicacearum* es una bacteria asociada a las raíces de las plantas y una de las mayores colonizadoras de raíces de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* (Ortet et al., 2011). Asimismo, se han realizado estudios en los que se ha demostrado su acción contra *Microdochium nivale* y *Fusarium*, responsables del moho blanco en cereales como el trigo y el centeno (Levenfors et al., 2008) y contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, causante de la podredumbre de la raíz en trigo (Ross et al., 2000).

Aunque varias cepas presentaron una buena protección contra el ataque del hongo, pues tanto los parámetros de crecimiento como los valores en la escala cualitativa de severidad no difirieron del control sin inocular con el hongo, fue el tratamiento inoculado con la cepa SCFA 1-2, el único que difirió significativamente del control inoculado con el patógeno (*Fusarium*) en los parámetros de crecimiento, no así en la severidad, aunque como se apuntó anteriormente presentó un valor bajo en dicha escala. También es importante recalcar que SCFA 1-2 produjo los valores en los parámetros de crecimiento mayores de todos los tratamientos, incluso valores más altos que el control sin inocular, aunque la diferencia no fue significativa. Este resultado concuerda con estudios preliminares llevados a cabo por Jeong et al. (2012), sobre las características de *B. siamensis*, en los que se encontró que incrementaba el crecimiento de explantes de *A. thaliana*, sin la mediación de contacto físico en una placa Petri, lo que sugiere la producción de compuestos volátiles que promueven el crecimiento. Por su parte, la estrechamente relacionada especie *B. amyloliquefaciens*, también ha demostrado su capacidad como promotora de crecimiento; actúa mediante la biosíntesis de ácido indolacético (IAA) (Idris et al., 2007) y la producción de fitasas que catalizan la liberación de fósforo presente en los fitatos del suelo (Idriss et al., 2002). Existen formulaciones comerciales de esta especie como el BioYield™ y RhizoVital®.

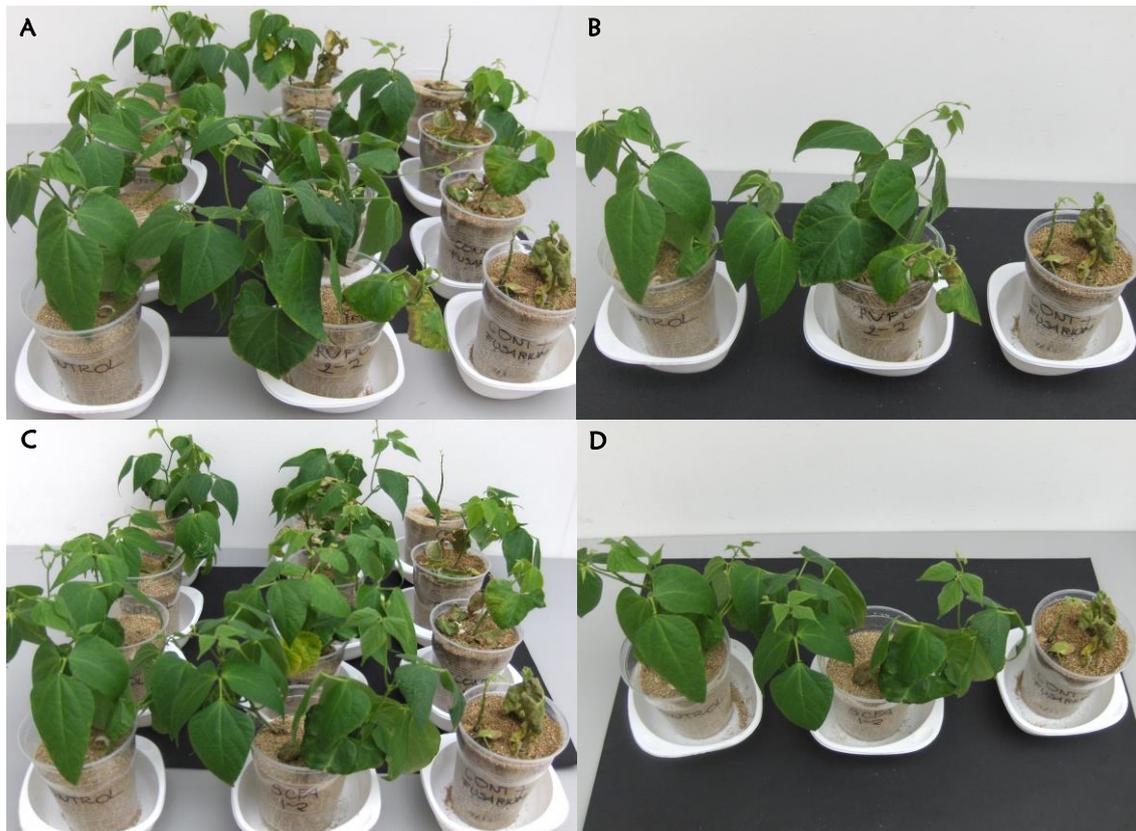


Figura 4.3. Pruebas de biocontrol de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* con bacterias endofíticas en plantas de alubia en condiciones gnotobióticas. A, B. De izquierda a derecha: control sin inocular, tratamiento inoculado con *Fusarium* y la cepa bacteriana RVPB 2-2 y control inoculado con *Fusarium*. C, D. De izquierda a derecha: control sin inocular, tratamiento inoculado con *Fusarium* y la cepa bacteriana SCFA 1-2 y control inoculado con *Fusarium*.

La cepa RVPB 2-2, fue una de las cuatro mejores biocontroladoras en el ensayo *in vitro*, al contrario de SCFA 1-2 que fue la que peor controló a *Fusarium* en este ensayo. En este sentido, existen otras bacterias que a pesar de que *in vitro* tuvieron efecto contra el hongo, *in vivo* no frenaron el ataque del mismo, ya que la severidad no difirió del control inoculado con el patógeno, ni del desarrollo de la parte aérea. Entre esas cepas destacan RVSV 1-5 y VCC 3-3, ambas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Tabla 4.5). La técnica de enfrentamientos duales es útil en la búsqueda de cepas antagonistas cuando se cuenta con un alto número de cepas, sin embargo es poco realista, y exhibe poca correlación entre los resultados *obtenidos in vitro* y los resultados *obtenidos in vivo*, como se ha descrito en estudios anteriores (Williams y Asher, 1996; Kim et al., 2008). Esta poca correlación entre la acción *in vivo* e *in vitro* podría deberse a que la acción de la cepa sobre el patógeno se desarrolla en un ambiente ficticio, sin otros competidores, sin suelo y sin la planta hospedera. En los ensayos de enfrentamientos duales la aparición de un halo de inhibición evidencia la

producción de metabolitos secundarios inhibitorios del crecimiento por parte de las cepas bacterianas, sin embargo, en ensayos en invernadero o en campo este mecanismo de acción podría no ser suficiente para el control del patógeno o la misma cepa podría activar otro mecanismo de acción imposible de detectar en los ensayos de enfrentamientos duales; por lo tanto una cepa que muestra buenos resultados *in vitro*, puede comportarse de manera contraria en ensayos en invernadero o campo o viceversa.

Tabla 4.5. Severidad del ataque fúngico (escala del CIAT) y biomasa producida por plantas de alubia en condiciones gnotobióticas inoculadas con *F. oxysporum f. sp. phaseoli* y diferentes bacterias endofíticas aisladas en Castilla y León con actividad *in vitro* contra dicho hongo, frente a un control sin inocular y a otro control inoculado solamente con el patógeno. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento: Cepa inoculada	Biomasa aérea fresca (g planta <sup>-1</sup> )		Biomasa aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )		Severidad	
RVSV 1-5	1,60	a	0,215	a	6,50	de
VCC 3-3	1,58	a	0,216	a	7,25	e
Control inoculado solo con <i>Fusarium</i>	1,85	a	0,244	a	4,75	abcde
RVSV1-2	2,32	ab	0,266	ab	6,00	cde
VCV 3-2	2,83	ab	0,368	abc	5,25	abcde
MTA 1-3	2,41	ab	0,373	abc	5,75	bcde
RVPA 1-4	2,88	ab	0,374	abc	5,25	abcde
MTA 1-2	3,07	ab	0,390	abc	5,00	abcde
SCE 3-4	2,75	ab	0,393	abc	4,75	abcde
MMM 3-4	3,37	ab	0,443	abc	3,50	abcd
RVSV 1-3	3,78	ab	0,448	abc	2,50	abc
SCFB 3-4	3,68	ab	0,551	abc	5,25	abcde
SCFB 3-1	4,06	ab	0,554	abc	2,25	ab
SCFB 2-2	4,59	ab	0,668	abc	1,75	a
RVPB 2-2	4,81	ab	0,701	abc	2,75	abc
Control sin inocular	5,21	ab	0,808	bc	No afectada	
SCFA 1-2	5,83	b	0,906	c	1,75	a
Media cuadrática	12,694		0,338		25,438	
F	2,523**		3,444***		6,300***	

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

#### 4.2.2 Inoculación en plantas de pimiento.

La inoculación de plantas de pimiento con bacterias endofíticas biocontroladoras *in vitro* del hongo *P. caccpsici* y con el mismo hongo, dio como resultado el

biocontrol de este patógeno por parte de varias cepas bacterianas. Las bacterias que mejor controlaron al patógeno fueron las cepas SCFC 1-2 y PPSA 2-3, ambas *B. pumilus* (Tabla 4.6). Esta especie se ha comercializado como biofungicida en frutales, vegetales y soja, contra patógenos foliares causantes de roya, mildiu polvoso y botritis (Pérez-García et al., 2011). Los tratamientos inoculados con estas dos cepas, mostraron diferencias altamente significativas con respecto al control inoculado solamente con el hongo patógeno, para todos los parámetros de crecimiento evaluados: biomasa aérea seca y fresca y biomasa seca de la raíz. Además de estas bacterias otras cuatro cepas ejercieron biocontrol ante *Phytophthora* (RVSV 1-2, BLQ 3-2, FVA 1-5 y MMM 2-1); las plantas inoculadas con estas cepas, al igual que en el caso anterior, presentaron diferencias de biomasa aérea seca y fresca altamente significativas con respecto al control inoculado solamente con *Phytophthora*, sin embargo no presentaron diferencias significativas en la biomasa seca de la raíz (Tabla 4.6).

Asimismo, la severidad del ataque fúngico fue mucho menor en las plantas inoculadas con las cepas señaladas en el párrafo anterior, siendo los valores más bajos y por lo tanto las que presentaron síntomas más leves de enfermedad las inoculadas con las cepas SCFC 1-2 y PPSA 2-3 de *B. pumilus*. No obstante, las diferencias en severidad entre los diferentes tratamientos no fueron significativas (Tabla 4.6). Es importante destacar que estas cepas no fueron las mejores biocontroladoras del hongo en las pruebas *in vitro*, es más, la SCFC 1-2, fue la que peor control ejerció (Tabla 4.4), al igual que ocurrió con la mejor cepa que controló a *Fusarium* en alubia. Como se explicó anteriormente, esta falta de correlación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, puede atribuirse a varias causas, entre ellas al mecanismo de acción utilizado por la cepa antagonista según el patógeno o el ambiente en que se encuentre. Al respecto, Kim et al. (2008) evaluaron rizobacterias extraídas de plantas de pepino, pimiento y tomate para el control de *Phytophthora* en pimiento; las cepas bacterianas que mejor controlaron al patógeno, no inhibieron el crecimiento micelial en los enfrentamientos duales, indicando así que el mecanismo de acción de estas cepas podría ser otro diferente a la producción de metabolitos, como por ejemplo la competencia o el parasitismo.

Por otra parte, las dos cepas indicadas como mejores controladoras de la enfermedad, no presentaron diferencias frente al control negativo (no inoculado con el patógeno), ni en biomasa aérea ni radicular. Asimismo cabe destacar que con la cepa SCFC 1-2, todos los parámetros de crecimiento de la planta fueron superiores que en el citado control, si bien las diferencias no fueron significativas. No obstante, a pesar de la falta de significación estadística, puede afirmarse que además del biocontrol hay indicios de efecto promotor del crecimiento vegetal por parte de dicha bacteria. Existen numerosos estudios que respaldan esta acción

estimuladora de crecimiento por parte de *B. pumilus*. La promoción de crecimiento de *B. pumilus* está asociada con la producción de giberelinas, ácido absísico (ABA) y ácido jasmónico (Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Joo et al., 2005; Forchetti et al., 2007).

Tabla 4.6. Severidad del ataque fúngico (escala de Kim et al. (1989)) y biomasa producida por plantas de pimiento en condiciones gnotobióticas inoculadas con *P. cactysici* y diferentes bacterias endofíticas aisladas en Castilla y León con actividad *in vitro* contra dicho hongo, frente a un control sin inocular y a otro control inoculado solamente con el patógeno. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento: Cepa inoculada	Biomasa aérea fresca		Biomasa aérea seca		Biomasa raíz seca		Severidad	
	(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )		Valor medio	Desviación típica
Control inoculado solo con <i>Phytophthora</i>	1,44	a	0,55	a	0,19	a	4,75	0,71
SCFC 2-2	3,17	ab	0,73	ab	0,24	ab	4,38	1,19
VCC 3-3	5,27	abc	0,99	abc	0,36	ab	3,00	2,51
RVSV 1-5	5,94	abc	1,01	abc	0,44	abcd	2,75	1,98
VCV 3-2	6,59	abc	1,02	abc	0,43	abcd	2,38	1,85
RVSV 1-3	6,59	abc	1,05	abc	0,47	abcd	2,75	1,28
FVA 2-3	7,08	abcd	1,07	abc	0,41	abc	1,75	1,75
RVPB 2-2	8,04	bcd	1,15	abc	0,56	bcd	1,63	0,52
MMM 2-1	8,23	bcd	1,21	cd	0,55	bcd	2,13	0,64
FVA 1-5	8,32	bcd	1,13	cd	0,43	abcd	1,63	1,06
BLQ 3-2	8,55	bcd	1,27	cd	0,54	abcd	1,75	1,16
RVSV 1-2	8,80	bcd	1,23	cd	0,54	abcd	1,63	1,41
PPSA 2-3	9,44	cd	1,33	cd	0,72	cd	1,38	0,52
Control sin inocular	10,12	cd	1,25	cd	0,54	abcd	No afectado	No afectado
SCFC 1-2	11,21	d	1,48	d	0,76	d	0,50	0,93
Media cuadrática	50,416	0,410	0,180					
F	4,772 ***	3,234***	4,521***					

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05



Figura 4.4. Pruebas de biocontrol de *P. capsici* con bacterias endofíticas en plantas de pimiento en condiciones gnotobióticas. De izquierda a derecha: control inoculado con *Phytophthora*, tratamiento inoculado con *Phytophthora* y con la cepa SCFC 1-2 y control sin inocular con *Phytophthora*.

### 4.3 Pruebas en Invernadero: microcosmos

#### 4.3.1 Inoculación de plantas de alubia

La aplicación de combinaciones de agentes de biocontrol compatibles entre sí para el combate de enfermedades es una estrategia que se asemeja más a lo que ocurre naturalmente en el suelo, en donde el control se ejerce debido a la acción de diversos antagonistas y no a la acción de altas concentraciones de uno solo, sobre todo si los microorganismos utilizados presentan modos de acción diferentes o complementarios (Whipps, 2001; Berendsen et al., 2012) que les permitan adaptarse a diversas condiciones ambientales.

La inoculación de combinaciones binarias de microorganismos frente a un control inoculado solo con el hongo y un control sin inocular, produjo diferencias altamente significativas en todas las variables dependientes analizadas (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Comparación de los valores medios de tres variables dependientes, obtenidos en microcosmos para el experimento de biocontrol de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* en alubia. Los tratamientos consistieron en ocho combinaciones binarias de micorrizas, PGPR y *Rhizobium leguminosarum* frente a dos controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Biomasa aérea fresca		Biomasa aérea seca		Severidad	
	(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )			
F + SCFA 1-2	2,60	a	0,60	a	7,5	c
F + RVPB 2-2	3,33	a	0,79	ab	7,8	c
A + SCFA 1-2	3,67	a	0,56	a	7,3	c
Control inoculado solo con <i>Fusarium</i>	3,84	a	0,73	a	7,6	c
A + LET1910	4,35	a	0,76	a	6,0	bc
LET1910 + RVPB 2-2	5,23	ab	0,80	abc	5,8	bc
F + LET1910	6,86	abc	0,98	abc	5,7	bc
A + RVPB 2-2	7,51	abc	0,94	abc	5,7	bc
LET1910 + SCFA 1-2	10,78	bc	1,43	bc	3,8	ab
Control sin inocular	11,17	c	1,46	c	1,0	a
Media cuadrática	112,802		1,177		52,712	
F	5,624 ***		4,617***		9,034***	

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05

De todas las combinaciones binarias estudiadas, solo una de ellas, formada por el rizobio LET1910 (*R. leguminosarum*) y la bacteria endofítica SCFA 1-2 (*B. siamensis*), redujo significativamente la severidad de los efectos del hongo sobre la planta según la escala visual del CIAT (Pastor-Corrales, 1987). Además, la biomasa aérea producida por las plantas inoculadas con esta combinación, no difirió de la del control negativo (no inoculado con el patógeno), y fue significativamente más elevada que la del control positivo (inoculada con el patógeno) (Tabla 4.7 y Figura 4.5).

Parece ser que la acción antagonista mostrada por *B. siamensis* en los ensayos gnotobióticos y reportada por Jeong et al. (2012) sumada a la acción de *R. leguminosarum* resultó ser la mejor opción para el control de *Fusarium*. La aportación de *R. leguminosarum* en el control de la enfermedad podría deberse a la mejora en la nutrición de la planta por la fijación de nitrógeno realizada por el rizobio, o bien, a la interacción con el patógeno. Existen varios estudios que demuestran la acción biocontroladora de *Rhizobium*. En un estudio realizado por Dar et al. (1997) para evaluar el control de *Fusarium* en alubia, por parte del hongo micorrícico *G. mosseae* y *R. leguminosarum*, se observó que la

coinoculación de *G. mosseae* y *R. leguminosarum* disminuyó significativamente la incidencia de la enfermedad.

En cuanto al modo de acción de *R. leguminosarum* como biocontrolador, se ha reportado la producción por parte de *Rhizobium* de rizobitoxina, compuesto responsable de la restricción de la invasión de tejidos de hongos parásitos (Chakraborty y Chakraborty, 1989), se ha observado inhibición del crecimiento micelial mediante la producción de metabolitos secundarios (Ehteshamul-Haque et al., 1993; Bardin et al., 2004) y producción de bacteriocina, un antibiótico producido por cepas de *R. trifolii* y *R. lupini* (Roslycky, 1967).



Figura 4.5. Selección de combinaciones binarias de microorganismos para biocontrol. A. *F.oxysporum f. sp. phaseoli* en alubia. B. *P.cacpsici* en pimiento. La imagen que se observa corresponde a una unidad experimental de uno de los tres bloques.

En las restantes combinaciones, con tres de ellas no hubo ningún efecto de biocontrol, y con otras 4 hubo un ligero efecto, debido a que los valores de severidad fueron ligeramente inferiores que en el control positivo, y a que la biomasa media generada por las plantas fue ligeramente superior, pero se trata de tendencias débiles y no de diferencias significativas. Por tanto, la única combinación binaria realmente eficaz en suelo real, fue la indicada en el párrafo anterior. Este hecho refuerza la hipótesis de que la acción biocontroladora es el resultado de la combinación de mecanismos de acción de los microorganismos aplicados en los cócteles, ya que ninguno de los otros tratamientos que contenían *R. leguminosarum* o *B. siamensis* mostró ser efectivo en el control del *Fusarium*.

#### 4.3.2 Inoculación de plantas de pimiento.

Al igual que en alubia, también en este caso hubo diferencias significativas para todas las variables analizadas entre tratamientos, según el análisis de varianza (Tabla 4.8).

## Biocontrol

Tabla 4.8. Comparación de los valores medios de tres variables dependientes, obtenidos en microcosmos para el experimento de biocontrol de *P. cacpsici* en pimiento. Los tratamientos consistieron en ocho combinaciones binarias de micorrizas, PGPR y *R. leguminosarum* frente a tres controles. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Biomasa aérea fresca		Biomasa aérea seca		Severidad	
	(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )			
Control con <i>Phytophthora</i>	0,109	a	0,025	a	4,667	e
F + PPSA2-3	0,395	ab	0,068	ab	3,917	de
F + SCFC1-2	0,531	ab	0,121	ab	3,833	de
LET1910 + SCFC1-2	0,542	ab	0,116	ab	3,250	cde
F + LET1910	0,670	ab	0,095	ab	2,083	abcd
A + LET1910	0,738	ab	0,130	ab	3,667	cde
LET1910 + PPSA2-3	0,932	ab	0,155	ab	1,417	abc
A + SCFC1-2	1,426	ab	0,219	ab	0,750	ab
A + PPSA2-3	1,509	ab	0,224	ab	2,417	bcde
Control con fungicida	1,649	b	0,264	b	0,083	ab
Control sin inocular	1,664	b	0,232	ab	0,000	a
Media Cuadrática	3,613		0,069		32,073	
F	3,109**		2,520**		9,999***	

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\* para  $p$  entre 0,001 y 0,01; \* para  $p$  entre 0,01 y 0,05.

Una de las combinaciones binarias, concretamente la compuesta por la micorriza A (*G. mosseae*) y la cepa SCFC 1-2 (*B. pumilus*) fue la que mejor controló la enfermedad, ya que la severidad de los efectos sobre las plantas, según la escala visual de Kingkun et al. (1989) y la biomasa producida por las plantas tratadas con esta combinación binaria, no difirió de los valores correspondientes a los controles negativo y con fungicida.

De igual forma, las plantas tratadas con la combinación entre la micorriza A y la cepa PPSA 2-3 (*B. pumilus*) produjeron la misma cantidad media de biomasa que

los controles negativo y con fungicida, pero la severidad del ataque fue superior a la de dichos controles y sin embargo no difirió de la severidad del ataque en el control positivo.

El antagonismo es el principal mecanismo de biocontrol que se ha estudiado en especies del género *Bacillus* (Pérez-García et al., 2011). Este género produce diversas moléculas biológicamente activas; algunas de ellas inhiben directamente el crecimiento de hongos (Schallmeyer et al., 2004), entre ellas enzimas degradadoras de la pared celular, como quitinasas, glucanasas y proteasas, y antibióticos peptídicos (Shoda, 2000). Los lipopéptidos son los antibióticos más frecuentemente producidos por *Bacillus* y además los más estudiados; muestran actividad antibacteriana y antifúngica y adicionalmente pueden mediar el biocontrol a través de resistencia sistémica inducida (ISR) (Ongeny Jacques, 2008).

En relación con el mecanismo de acción de *G. mosseae*, Cordier et al. (1998) identificaron que *G. mosseae* inhibió el desarrollo de *P. parasítica* en plantas de tomate mediante ISR, mientras que en otro estudio, se observó que las raíces micorrizadas con *G. mosseae* no presentaban necrosis, con lo cual el efecto del hongo AM fue directo sobre *Phytophthora* (Vigo et al., 2000). Estos y varios estudios han demostrado la clara acción biocontroladora de *G. mosseae* sobre diferentes patógenos, como *Rhizoctonia* en tomate (Kareem & Hassan, 2014) o *Fusarium* en alubia (Dar et al., 1997). De todas formas, la efectividad biocontroladora de los hongos AM, depende no solo de especie de hongo empleada sino también del sustrato o ambiente y del hospedador (Linderman, 2000; Whipps, 2004).

Como se apuntó anteriormente, la acción biocontroladora puede verse mejorada con la adición de dos o más microorganismos biocontroladores y aunque en los ensayos realizados en microcosmos no se probó la acción de cada microorganismo por separado para evaluar su acción y compararla posteriormente con la acción conjunta, sí se obtuvieron resultados positivos para el biocontrol tanto de *Fusarium* como de *Phytophthora* atribuibles a la sinergia de ambos microorganismos y partiendo de la base de que la coinoculación mejora el biocontrol. Consecuentemente, al igual que en el ensayo en alubia, no todos los tratamientos que contenían *B. pumilus* o *G. mosseae* (cepa A) fueron buenos controladores de *Phytophthora*, incluso los tratamientos que contenían una cepa diferente de *G. mosseae* (F) no arrojaron buenos resultados. Siguiendo esta base, varios autores obtuvieron resultados similares, sin embargo no concretamente en el control de *Phytophthora* por parte de *G. mosseae* y *B. pumilus*. Edwards et al. (1998) encontraron que la colonización y presencia de *G. mosseae* incrementó las poblaciones en la rizosfera del agente biocontrolador *P. fluorescens*; en un ensayo realizado por Akhtar y Siddiqui (2008), la mezcla de *G. intraradices*, *B. pumilus* y

*Pseudomonas* redujo significativamente la población del nematodo *Meloidogyne incognita* y la pudrición de la raíz producida por el hongo *Macrophomina phaseolina*, ambos agentes causales de la pudrición de la raíz en garbanzo.

Tanto para el control de fusariosis en alubia como de *Phytophthora* en pimiento ha sido posible encontrar al menos una combinación que presente un control óptimo de la enfermedad. En el caso de la alubia en la zona no se suelen usar fungicidas para el control de los hongos del suelo, por lo que no existe un referente de naturaleza química con el que comparar. Sin embargo en el pimiento se puede comparar con el tratamiento fungicida habitualmente utilizado en campo, y se observa que el control con la mejor combinación binaria no llega a ser tan eficaz, pero se alcanza un buen nivel.

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre agentes de biocontrol, y de la necesidad por la búsqueda de alternativas al uso de biopesticidas, la cantidad de bioformulaciones de microorganismos disponibles a nivel comercial para el control de enfermedades en plantas es aún muy reducido. Por una parte, aún queda mucho que dilucidar sobre los mecanismos de acción, la especificidad de hospedadores, patógenos y ambientes, factores que facilitarían las combinaciones adecuadas de microorganismos, lo que conllevaría a un mejor uso biotecnológico de los mismos. Por otra parte, la reticencia al cambio por parte de productores acostumbrados al uso de pesticidas y la falta de consistencia en los resultados obtenidos hacen del control biológico una herramienta aún por explotar en el sector agrario.

## 5 REFERENCIAS

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Elsevier. Amsterdam. 948 p.
- Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2008). *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: Effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of General Plant Pathology, 74(1), 53-60.
- Akköprü, A., & Demir, S. (2005). Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. Journal of Phytopathology, 153(9), 544-550.
- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P., & Díaz-Mínguez, J. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Applied and Environmental Microbiology, 65(8), 3335-3340.

- Arora, N., Kang, S., & Maheshwari, D. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 81(6), 673-677.
- Arrebola, E., Jacobs, R., & Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 386-395.
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457-464.
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M., & Calvet, C. (2002). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. En: Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J. M., & Haselwandter, K. (eds). *Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland.
- Bardin, S. D., Huang, H., Pinto, J., Amundsen, E. J., & Erickson, R. S. (2004). Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Canadian Journal of Botany*, 82(3), 291-296.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P.A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 478-486.
- Calvet, C., Pinochet, J., Hernández-Dorrego, A., Estaún, V., & Camprubí, A. (2001). Field microplot performance of the peach-almond hybrid GF-677 after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root-knot nematodes. *Mycorrhiza*, 10(6), 295-300.
- Chakraborty, U., & Chakraborty, B. (1989). Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi* on pea affecting disease development and phytoalexin production. *Canadian Journal of Botany*, 67(6), 1698-1701.
- Chang, S. H., Kwack, M. S., Kim, Y. S., Lee, J. Y., & Kim, K. D. (2001). A rapid radicle assay for prescreening antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* on pepper. *Mycobiology*, 29(4), 218-223.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles,

mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.

Cordier, C., Pozo, M., Barea, J., Gianinazzi, S., & Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10), 1017-1028.

Dar, G. H., Zargar, M., & Beigh, G. (1997). Biocontrol of Fusarium root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. *Microbial Ecology*, 34(1), 74-80.

Díaz-Mínguez, J. M., Alves-Santos, F. M., Benito, E. M., & Eslava, E. (1996). Fusarium wilt of common bean in the Castilla y León region of Spain. *Plant Disease*, 80, 600.

Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Schisler, D. A. (2013). Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of Fusarium head blight. *Biological Control*, 64(2), 166-175.

Dutta, S., Mishra, A., & Dileep Kumar, B. (2008). Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(2), 452-461.

Edwards, S. G., Young, J. P. W., & Fitter, A. H. (1998). Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 166(2), 297-303.

Ehteshamul-Haque, S., & Ghaffar, A. (1993). Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. *Journal of Phytopathology*, 138(2), 157-163.

Filion, M., St-Arnaud, M., & Jabaji-Hare, S. (2003). Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology*, 93(2), 229-235.

Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1145-1152.

- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol 1. Annual Review of Phytopathology, 43, 337-359.
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology, 20(8), 338-343.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, 2012, 1-15.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R. Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia Plantarum, 111(2), 206-211.
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology, 41(1), 117-153.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular Plant-Microbe Interactions, 20(6), 619-626.
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology (Reading, England), 148(Pt 7), 2097-2109.
- Jeong, H., Jeong, D. E., Kim, S. H., Song, G. C., Park, S. Y., Ryu, C. M., Choi, S. K. (2012). Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613T. Journal of Bacteriology, 194(15), 4148-4149.
- Jiang, Z., Guo, Y., Li, S., Qi, H., & Guo, J. (2006). Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against Phytophthora blight of bell pepper. Biological Control, 36(2), 216-223.
- Joo, G., Kim, Y., Kim, J., Rhee, I., Kim, J., & Lee, I. (2005). Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. Journal Of Microbiology-Seoul-, 43(6), 510.
- Kareem, T., & Hassan, M. (2014). Evaluation of *Glomus mosseae* as biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* on tomato. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 4(2), 15-19.

- Khan, N., Schisler, D., Boehm, M., Slininger, P., & Bothast, R. (2001). Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Disease*, 85(12), 1253-1258.
- Kim, H. S., Sang, M. K., Jeun, Y., Hwang, B. K., & Kim, K. D. (2008). Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling *Phytophthora* blight of pepper. *Crop Protection*, 27(3), 436-443.
- Kim, K., Nemeč, S., & Musson, G. (1997). Control of *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Applied Soil Ecology*, 5(2), 169-179.
- Kim, P., & Chung, K. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 177-183.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 3), 716-721.
- Kingkun, D., Taeyangkun, H., & Hongsanho, J. (1989). Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 73, 745-747.
- Kloeppe, J., Rodriguez-Kabana, R., Zehnder, A., Murphy, J., Sikora, E., & Fernandez, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28(1), 21-26.
- Koske, R., & Gemma, J. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, 92(4), 486-488.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Hervás, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2001). Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of *Fusarium* wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology*, 91, 807-816.
- Larsen, J., Graham, J. H., Cubero, J., & Ravnskov, S. (2012). Biocontrol traits of plant growth suppressive arbuscular mycorrhizal fungi against root rot in tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. *European Journal of Plant Pathology*, 133(2), 361-369.

- Levenfors, J. P., Eberhard, T. H., Levenfors, J. J., Gerhardson, B., & Hökeberg, M. (2008). Biological control of snow mould (*Microdochium nivale*) in winter cereals by *Pseudomonas brassicacearum*, MA250. *Biocontrol*, 53(4), 651-665.
- Linderman, R. G. (2000). Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. En: Kapulnik, Y., & Douds, D. D. (eds). *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. Springer. Netherlands.
- Lugtenberg, B. J. J., Malfanova, N., Kamilova, F., & Berg, G. (2013). Microbial control of plant root diseases. En: de Bruijn, F. J. (ed). *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. John Wiley & Sons.
- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M., Casquero, P., Velázquez, E., & González-Andrés, F. (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(11), 2283-2293.
- Nogales, A., Aguirreolea, J., Santa María, E., Camprubí, A., & Calvet, C. (2009). Response of mycorrhizal grapevine to *Armillariamellea* inoculation: Disease development and polyamines. *Plant and Soil*, 317(1-2), 177-187.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.
- Ortet, P., Barakat, M., Lalaouna, D., Fochesato, S., Barbe, V., Vacherie, B., Achouak, W. (2011). Complete genome sequence of a beneficial plant root-associated bacterium, *Pseudomonas brassicacearum*. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 3146-11.
- Pastor Corrales, M. A. (1987). Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease*, 71, 990-993.
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187-193.
- Rajkumar, M., Lee, W. H., & Lee, K. J. (2005). Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. *Journal of Basic Microbiology*, 45(1), 55-63.
- Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158-1164.

- Recep, K., Fikretin, S., Erkol, D., & Cafer, E. (2009). Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium species* using PGPR strains. *Biological Control*, 50(2), 194-198.
- Rigaud, J., & Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacterioids. *Journal of General Microbiology*, 88, 223-228.
- Ristaino, J. B., & Johnston, S. A. (1999). Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. *Plant Disease*, 83(12), 1080-1089.
- Roslycky, E. (1967). Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 13(4), 431-432.
- Ross, I. L., Alami, Y., Harvey, P. R., Achouak, W., & Ryder, M. H. (2000). Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1609-1616.
- Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, K., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2009). Fluorescent Pseudomonad mixtures mediate disease resistance in rice plants against sheath rot (*Sarocladium oryzae*) disease. *Biocontrol*, 54(2), 273-286.
- Sayeed Akhtar, M., & Siddiqui, Z. A. (2008). Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. *Crop Protection*, 27(3-5), 410-417.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17.
- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515-521.
- Urbano-Terrón, P. (2002). *Fitotecnia. Ingeniería de la producción vegetal*. Ediciones mundi-prensa. Madrid, España.
- Vigo, C., Norman, J., & Hooker, J. (2000). Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology*, 49(4), 509-514.
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.

- Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1198-1227.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(Spec Issue), 487-511.
- Williams, G., & Asher, M. (1996). Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Protection*, 15(5), 479-486.
- Yao, M., Tweddell, R., & Desilets, H. (2002). Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza*, 12(5), 235-242.



**Discusión general**



El proceso de selección de microorganismos para el desarrollo de un biofertilizante está compuesto por diferentes etapas que incluyen ensayos a nivel de laboratorio, cámara de cultivo, invernadero y campo (Barriuso et al., 2008; Mulas et al., 2013).

Aunque se desarrollaron pruebas *in vitro* para determinar el potencial PGP de las cepas bacterianas aisladas, los posteriores ensayos en cámara de crecimiento (ensayos gnotobióticos), en microcosmos y en campo, demostraron que su potencial no siempre está relacionado con la acción promotora de crecimiento de las cepas cuando se encuentran en contacto con la planta. Por consiguiente, la selección de los microorganismos utilizados como biofertilizantes, no depende exclusivamente de su comportamiento *in vitro*.

El hecho de que una cepa muestre varias características PGP *in vitro* (producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, producción de IAA, producción de ACC desaminasa y capacidad de crecimiento en medio libre de nitrógeno), no la convierte en todos los casos en la mejor PGPR cuando se inocula en un planta. De hecho, cepas que no presentan buenas características como PGPR *in vitro* pueden presentar buenas características *in vivo* de promoción del crecimiento vegetal (Smyth et al., 2011). La evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal de una cepa se debe hacer en condiciones lo más similares posibles a las condiciones naturales de producción del cultivo. En este sentido y como se abordó en el capítulo de inoculaciones en planta se demostró que los ensayos en invernadero (microcosmos) en macetas, tanto para alubia como para pimiento no son adecuados, ya que la producción real de estos cultivos no se realiza en estas condiciones, lo que refuerza también los datos obtenidos en otros ensayos (Mulas et al., 2013).

Las cepas bacterianas que se seleccionaron para la inoculación en campo fueron la RVPB 2-2 (*P. brassicaceanum* subsp. *neaurantiaca*) para alubia y la SCFB 3-1 (*B. siamensis*) para pimiento. La primera cepa, RVPB 2-2, procedente de raíces de alubia, presentó varios mecanismos de acción PGP en las pruebas *in vitro*: produjo sideróforos, solubilizó fosfatos y además fue la quinta mejor con actividad ACC desaminasa. Sin embargo, la segunda cepa la SCFB 3-1, procedente de raíces de pimiento, solamente presentó una característica PGP *in vitro*, producción de sideróforos. Resultados similares se han obtenido en otros estudios. Ambrosini et al. (2012) encontraron que cepas aisladas de raíces de girasol que no produjeron auxinas en pruebas *in vitro* estimularon el crecimiento de la planta cuando se inocularon en condiciones gnotobióticas y que plantas inoculadas con cepas que no solubilizaron fosfatos contenían altos niveles de P (de Souza et al., 2013).

Por lo tanto, el efecto de una cepa sobre el crecimiento de una planta depende de la interacción con la planta y de uno o varios mecanismos de acción que pueden activarse simultáneamente (Martínez-Viveros et al., 2010; Glick, 2012).

No obstante, las pruebas *in vitro* permiten hacer una selección de bacterias para inocularlas en la planta que además tienen que estar claramente identificadas a nivel de especie para seleccionar aquéllas que no representen un riesgo para la salud de las personas o de las plantas. Por ejemplo, aunque cepas de *B. cereus* o de *B. anthracis* presentaran buenas características PGP *in vitro* e incluso se comportaran como promotoras del crecimiento en ensayos en planta, no pueden ser utilizadas, ya que estas especies producen diarreas y vómitos por intoxicaciones alimentarias (Lund et al., 2000) y ántrax (Liu et al., 2014), respectivamente.

En cuanto a la clara acción promotora de crecimiento sobre alubia y pimiento de las cepas de hongos micorrícicos aislados y producidos durante este estudio e identificadas como *G. mosseae*, avala el proceso de selección y producción ejecutado.

Otra técnica importante que se utiliza para la producción de inóculo es el cultivo *in vitro*, su ventaja principal es que asegura la inocuidad del inóculo, ya que las condiciones de producción están mucho más controladas (Kapoor et al., 2008). Sin embargo también presenta desventajas: es una técnica costosa y la diversidad en términos de género es mucho más baja que en el sistema convencional (Ijdo et al., 2011), por lo que el sistema convencional realizado en este estudio sigue siendo el que ofrece mayores ventajas.

Por otro lado, al igual que las cepas bacterianas escogidas como PGP, las cepas escogidas como biocontroladoras deben ser evaluadas de manera integral. Las cepas que en las pruebas *in vitro* (enfrentamientos duales) fueron las mejores, no necesariamente lo fueron en los ensayos en planta en cámara de cultivo o en invernadero, por lo que la inoculación en planta junto con el patógeno es esencial para la selección de la cepa. Igualmente que en la selección de cepas para el desarrollo de biofertilizantes, es importante escoger cepas de especies que no signifiquen un riesgo -ni para el hombre, ni para la planta- si se utilizan como agentes de biocontrol.

Las cepas RVPB 2-2 (*P. brassicaceanum* subsp. *neoaurantiaca*) y la SCFA 1-2 (*B. siamensis*), aisladas de alubia y pimiento respectivamente fueron las que controlaron mejor a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* en alubia. Ambas cepas además de mostrar características biocontroladoras en las pruebas *in vitro*, también mostraron características PGP en dichas pruebas. Ambas cepas produjeron sideróforos y además la cepa RVPB 2-2, como se indicó anteriormente, solubilizó fosfato y presentó actividad ACC desaminasa. De acuerdo con Glick (2012),

algunas cepas actúan como biocontroladoras a través de la producción de sideróforos que presentan mayor afinidad por el hierro que los producidos por los patógenos, lo que limita la cantidad de hierro disponible para estos últimos evitando su proliferación (Schippers et al., 1987; Dowling et al., 1996). Del mismo modo, la inoculación de plantas con cepas PGP con actividad ACC desaminasa evita la formación del etileno. Las plantas sintetizan esta hormona en respuesta a la presencia de patógeno, lo que desencadena la aparición de síntomas en la planta. Por lo tanto esta es una forma de disminuir el daño causado por los patógenos (Glick & Bashan, 1997; Hao et al., 2007).

Las cepas aisladas de raíces de pimiento (SCFC 1-2) y de alubia (PPSA 2-3), respectivamente, identificadas como *B. pumilus* fueron las mejores controladoras de *P. capsici* en pimiento. Ninguna de estas cepas mostró actividad PGP en los ensayos *in vitro*. En este caso, los posibles mecanismos de acción de estas cepas han sido discutidos en el capítulo de biocontrol de la presente memoria.

En definitiva, la evaluación *in vitro* de características PGP y de características biocontroladoras de la colección de bacterias obtenidas en este estudio, ha sido crucial, no solo como una fase inicial para la selección de cepas, sino también para su caracterización. Junto con las técnicas moleculares, han permitido caracterizar poblaciones de bacterias asociadas a las raíces de alubia y pimiento producidas en las IGP objeto de estudio. En este sentido este estudio es pionero, ya que no se había realizado ninguno de este tipo anteriormente en estas IGP, y en general existen muy pocos estudios a nivel mundial en alubia y pimiento.

El objetivo de obtener microorganismos aptos para ser utilizados como biofertilizantes y biocontroladores se ha cumplido al finalizar este estudio. Las siguientes etapas para la obtención de un biofertilizante y de un biofungicida, deben incluir la evaluación de los microorganismos durante más periodos de siembra en el caso del biofertilizante, y en campo en el caso del biofungicida, así como también, la evaluación de soportes, formulaciones y supervivencia de los microorganismos en el soporte y en el campo después de su inoculación. Los resultados de la tesis muestran una importante oportunidad para el desarrollo de manera comercial de biofertilizantes y biofungicidas, respaldados por una sólida base científica que demuestra que es posible la sustitución de fertilizantes y pesticidas convencionales por productos a base de microorganismos autóctonos.

## Referencias

- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F. G., Vargas, L. K., y Passaglia, L. M. (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil*, 356(1-2), 245-264.
- Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. A., Lobo, A. P., García-Villaraco, A., y Mañero, F. J. G. (2008). Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). En: Ahmad, I., Pichtel, J., y Hayat, S. (eds). *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim.
- de Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., da Costa, P. B., Meyer, J., Vargas, L. K., . . . Passaglia, L. M. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern brazilian fields. *Plant and Soil*, 366 (1-2), 585-603.
- Dowling, D., Sexton, R., Fenton, A., Delany, I., Fedi, S., McHugh, B., . . . O’Gara, F. (1996). Iron regulation in plant-associated *Pseudomonas fluorescens* M114: implications for biological control. En: Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D., & Silver, S. (eds). *Molecular Biology of Pseudomonads*, American Society for Microbiology. Washington, DC.
- Glick, B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012, 1-15.
- Glick, B. R., y Bashan, Y. (1997). Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, 15(2), 353-378.
- Hao, Y., Charles, T. C., y Glick, B. R. (2007). ACC deaminase from plant growth-promoting bacteria affects crown gall development. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(12), 1291-1299.
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., y Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: Past, present, and future. *Mycorrhiza*, 21(1), 1-16.
- Kapoor, R., Sharma, D., y Bhatnagar, A. (2008). Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae*, 116(3), 227-239.
- Liu, S., Moayeri, M., y Leppla, S. H. (2014). Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 22(6), 317-325.

- Lund, T., De Buyser, M., y Granum, P. E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, 38(2), 254-261.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., y Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293-319.
- Mulas, D., Díaz-Alcántara, C., Mulas, R., Marcano, I., Barquero, M., Serrano, P., y González-Andrés, F. (2013). Inoculants based in autochthonous microorganisms, a strategy to optimize agronomic performance of biofertilizers. En: González-López, J. (ed). *Beneficial Plant-Microbial Interactions*, CRC Press.
- Schippers, B., Bakker, A. W., y Bakker, P. A. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1), 339-358.
- Smyth, E., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M., Dow, J., O’Gara, F., y Doohan, F. (2011). *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 683-692.



**Conclusiones**



## Conclusiones

- Se aislaron en total 122 cepas de bacterias endofíticas; 68 procedentes de raíces de alubia y 54 de raíces de pimiento. Estos resultados muestran diferencias en la abundancia de las cepas bacterianas endofíticas en diferentes suelos, pero no parecen correlacionarse con las características de los mismos.
- Se obtuvieron perfiles diferentes utilizando las enzimas *BanI*, *EcoRI*, *Hinfi*, *Sau3AI* y *StuI*. Las combinaciones de los diferentes resultados para cada cepa permitieron agruparlas en 19 perfiles de ARDRA diferentes y dentro de cada uno de ellos, se obtuvieron perfiles de TP-RAPD.
- En función de los perfiles de ARDRA y TP-RAPD, se identificaron 10 géneros de bacterias: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* y *Phyllobacterium*. El género *Bacillus* fue el predominante, tanto en alubia (29 cepas) como en pimiento (47 cepas); en alubia, además fueron importantes los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter*,
- Los resultados de las pruebas PGP *in vitro* realizadas a las cepas de bacterias endofíticas indicaron que el 48% del total de las cepas aisladas produjeron sideróforos, mientras que solamente el 14% mostraron la capacidad de solubilizar fosfato. Las 10 mejores cepas productoras de IAA correspondieron a cepas aisladas en alubia y las especies de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* fueron las mejores en todas las pruebas, excepto para la solubilización de fosfato. Muchas de las cepas de los géneros aislados han sido descritas como PGPR en diferentes cultivos.
- La actividad ACC desaminasa estuvo encabezada por cuatro cepas de *P. thivervalensis* y entre las mejores cepas capaces de crecer en medio libre de nitrógeno destacan especies del género *Bacillus*.
- Se seleccionaron seis morfotipos de hongos AM, cinco provenientes de alubia y uno provenientes de pimiento. Todos fueron identificados como *G. mosseae*.
- La cepa RVPB 2-1 (*S. maltophilia*) y la cepa RVPB 2-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neauriantaca*) tuvieron un claro efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas de alubia en condiciones gnotobióticas.
- Las cepas RVPB 2-2 y VCV 3-2 (*P. brassicacearum* subsp. *neauriantaca*), y SRN 3-2 (*B. oleronius*) en coinoculación con rizobios, mejoraron

## Conclusiones

significativamente la biomasa de nódulos y de la parte aérea de plantas de alubia en condiciones gnotobióticas.

- La cepa BSC 1-2 (*A. spiritinus*) tuvo un claro efecto promotor de crecimiento en plantas de pimiento en condiciones gnotobióticas.
- El microcosmos no es un buen medio para extraer conclusiones sobre biofertilizantes, es necesario realizar ensayos en campo.
- De acuerdo con los ensayos en campo se obtuvieron diferencias altamente significativas entre tratamientos, siendo la coinoculación en alubia de *G. mosseae* (F), *R. leguminosarum* (LCS0306) y *P. brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* (RVPB 2-2) y en pimiento de *G. mosseae* (A), *R. leguminosarum* (LET1910) y *B. siamensis* (SCFB 3-1), los tratamientos que produjeron los mejores rendimientos en ambos cultivos, por encima de los obtenidos cuando se realizaron inoculaciones binarias o en solitario, e incluso mayores que con los controles con el 100% de la fertilización nitrogenada.
- Se obtuvieron 23 cepas bacterianas que mostraron capacidad de biocontrol mediante inhibición de crecimiento en las pruebas *in vitro*; 16 controlaron a *Fusarium* y 13 controlaron a *Phytophthora*. Las cuatro cepas que produjeron mayores halos de inhibición de crecimiento, tanto en *Fusarium* como en *Phytophthora*, pertenecieron al género *Pseudomonas*, concretamente *P. brassicacearum* y *P. thivervalensis*. Estas cepas procedían de raíces de plantas de alubia.
- Las cepas bacterianas que mejor controlaron a *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* en plantas de alubia en condiciones gnotobióticas ya que produjeron los mejores resultados en la producción de biomasa aérea (fresca y seca) y presentaron valores bajos en la escala de severidad del ataque fúngico, fueron la RVPB 2-2 (*P. brassicacearum*) y la SCFA 1-2 (*B. siamensis*).
- Las bacterias que mejor controlaron a *P. cacysici* en plantas de pimiento en condiciones gnotobióticas fueron las cepas SCFC 1-2 y PPSA 2-3, ambas *B. pumilus*. Los tratamientos inoculados con estas dos cepas, mostraron diferencias altamente significativas con respecto al control inoculado solamente con el hongo patógeno, para todos los parámetros de crecimiento evaluados: biomasa aérea seca y fresca y biomasa seca de la raíz.
- La combinación binaria formada por el rizobio LET1910 (*R. leguminosarum*) y la bacteria endofítica SCFA 1-2 (*B. siamensis*), redujo significativamente la

severidad de los efectos de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* en plantas de alubia en los ensayos en microcosmos. Además, la biomasa aérea producida por las plantas inoculadas con esta combinación, no difirió de la del control negativo (no inoculado con el patógeno), y fue significativamente más elevada que la del control positivo (inoculada con el patógeno).

- La combinación binaria compuesta por la micorriza A (*G. mosseae*) y la cepa SCFC 1-2 (*B. pumilus*) redujo significativamente la severidad de los efectos de *P. capsici* en plantas de pimiento en los ensayos en microcosmos, ya que la severidad de los efectos sobre las plantas y la biomasa producida por las plantas tratadas con esta combinación binaria, no difirió de los valores correspondientes a los controles negativo y con fungicida.







Tabla A.1. Características físico-químicas de los suelos incluidos en la IGP “Alubia de La Bañeza – León” en los que se tomaron muestras de suelos y raíces para la obtención de microorganismos endófitos.

Suelo	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase Textural	pH	CE (1:2) (dS m <sup>-1</sup> )	Carbonatos (% caliza)	Materia Org. (%)	N total (%)	C/N	Fósforo Olsen (mg kg <sup>-1</sup> )	
SLB1	46	38	16	Franca	6,02	0,16	0	2,27	0,16	8,3	90,16	Muy alto
SLB2	42	46	12	Franca	6,74	0,16	0	3,35	0,21	9,21	61,84	Muy alto
SRN	40	38	22	Franca	6,00	0,15	0	4,33	0,24	10,56	72,67	Muy alto
BLQ	58	24	18	Franco arenosa	6,84	0,08	0	1,24	0,08	9,07	21,86	Medio
BMA	54	28	18	Franco arenosa	6,25	0,04	0	1,33	0,09	8,34	25,47	Alto
BCS	58	26	16	Franco arenosa	5,93	0,06	0	1,49	0,11	8,06	39,21	Muy alto
VCC	44	34	22	Franca	7,98	0,08	0	0,76	0,07	6,55	6,59	Muy bajo
VCV	54	28	18	Franco arenosa	6,88	0,16	0	0,79	0,07	6,59	15,47	Bajo
PPSA	42	16	42	Arcillosa	7,76	0,16	0	2,32	0,13	10,21	30,32	Alto
PPSB	50	26	24	Franco arcillo arenosa	6,20	0,06	0	1,42	0,09	8,85	26,30	Alto
PPSC	54	26	20	Franco arcillo arenosa	6,72	0,05	0	1,72	0,1	10,39	27,13	Alto
RVPA	38	46	16	Franca	6,06	0,12	0	1,37	0,09	8,57	13,25	Bajo
RVPB	34	46	20	Franca	6,52	0,13	0	1,3	0,09	8,25	27,41	Alto
RVSV	34	46	20	Franca	7,12	0,06	0	1,36	0,1	7,81	26,85	Alto

Suelo	CIC	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
			(cmol(+)) (kg <sup>-1</sup> )							(mgkg <sup>-1</sup> )	
SLB1	5,54	1,20	Muy alto	0,05	3,03	0,85	85,45	15,17	2,10	1,15	0,44
SLB2	8,37	1,04	Muy alto	0,04	5,09	1,00	31,45	6,30	0,97	1,06	0,44
SRN	7,23	1,05	Muy alto	0,06	4,31	0,95	66,67	8,97	1,51	1,42	0,48
BLQ	5,22	0,47	Medio	0,03	3,92	0,66	34,08	32,82	0,62	1,13	1,02
BMA	4,36	0,39	Medio	0,02	3,33	0,47	69,68	51,92	0,79	1,04	0,78
BCS	3,51	0,59	Alto	0,01	2,79	0,38	68,46	42,29	0,97	0,93	0,49
VCC	7,11	0,25	Bajo	0,04	7,97	0,63	10,45	12,76	0,24	0,44	0,87
VCV	5,85	0,31	Bajo	0,18	3,83	0,85	48,17	17,07	0,46	0,61	0,44
PPSA	16,62	0,87	Muy alto	0,12	13,71	2,58	14,63	15,37	0,74	0,65	0,87
PPSB	5,74	0,70	Alto	0,03	3,70	0,85	55,67	30,68	0,67	0,99	0,97
PPSC	5,94	0,59	Alto	0,04	4,63	0,83	88,14	20,11	0,80	1,06	0,92
RVPA	4,69	0,40	Medio	0,13	3,88	0,81	105,44	16,98	0,74	1,25	0,60
RVPB	5,18	0,44	Medio	0,20	4,56	0,94	83,06	10,79	0,89	1,56	0,65
RVSV	5,98	0,20	Muy bajo	0,23	5,61	0,73	81,46	10,39	0,86	1,56	1,04

Tabla A.2. Características físico-químicas de los suelos incluidos en la IGP “Pimiento de Fresno-Benavente” en los que se tomaron muestras de suelos y raíces para la obtención de microorganismos endófitos.

Suelo	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase Textural	pH	CE (1:2) (dS m <sup>-1</sup> )	Carbonatos (% caliza)	Materia Org. (%)	N total (%)	C/N	Fósforo Olsen (mgkg <sup>-1</sup> )	
FCA	36	32	32	Franco arcillosa	8,14	0,24	0,7427	1,48	0,11	7,63	53,37	Muy alto
FCB	70	16	14	Franco arenosa	6,4	0,11	0	0,96	0,06	9,17	44,76	Muy alto
FVA	42	38	20	Franca	8,13	0,12	0	1,51	0,1	8,89	7,70	Muy bajo
SCFA	56	28	16	Franco arenosa	8,1	0,29	0	1,49	0,1	8,42	27,83	Alto
SCFB	52	28	20	Franco arcillo arenosa	7,1	0,17	0	1,71	0,11	9,11	52,26	Muy alto
SCFC	46	24	30	Franco arcillo arenosa	8,21	0,18	1,411	1,62	0,11	8,35	43,79	Muy alto
SCE	36	40	24	Franca	8,1	0,36	0	2,45	0,15	9,35	12,14	Bajo
MTA	62	24	14	Franco arenosa	5,43	0,46	0	1,91	0,11	10,29	54,90	Muy alto
MMM	48	36	16	Franca	6,64	0,22	0	1,23	0,09	7,82	46,84	Muy alto
MJC	54	32	14	Franco arenosa	5,11	0,36	0	1,61	0,1	9,21	82,38	Muy alto

Suelo	CIC	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
				(cmol(+))	(kg <sup>-1</sup> )					(mgkg <sup>-1</sup> )	
FCA	10,19	0,47	Medio	0,06	14,40	2,37	8,13	9,29	1,11	0,76	0,23
FCB	3,56	0,54	Medio	0,02	2,42	0,31	39,44	18,46	0,87	0,73	0,32
FVA	7,96	0,22	Bajo	0,06	9,03	0,52	14,32	10,09	0,64	0,44	0,69
SCFA	7,17	0,56	Medio	0,32	10,33	1,06	28,49	8,88	0,74	0,64	0,60
SCFB	6,67	0,65	Alto	0,26	4,89	0,80	80,34	12,80	0,89	0,94	0,80
SCFC	10,46	0,95	Muy alto	0,16	14,64	1,20	17,98	7,46	0,71	0,61	0,43
SCE	11,82	0,51	Medio	0,54	12,73	1,37	18,08	8,34	0,78	0,84	0,88
MTA	5,16	0,98	Muy alto	0,07	3,45	0,52	57,20	34,51	1,14	1,97	1,59
MMM	6,12	0,90	Muy alto	0,16	3,19	0,65	71,19	10,70	1,08	1,31	0,38
MJC	4,37	0,95	Muy alto	0,25	2,82	0,39	122,77	27,25	1,78	2,70	0,52

Tabla A.3. Características físico-químicas de los suelos utilizados en los ensayos de microcosmos y campo.

Parámetro	Suelos utilizados en el ensayo de microcosmos		Suelos del ensayo de campo	
	IGP Alubia (Sueros de Cepeda)	IGP Pimiento (Fresno de la Vega)	Campos experimentales ESTIA	
Arena (%)	40	48	38	34
Limo (%)	44	22	30	34
Arcilla (%)	16	30	32	32
Clase Textural	Franca	Franco-Arcillo-Arenosa	Franco-Arcillosa	Franco-Arcillosa
pH	6,79	8,62	8,08	7,27
CE (1:2) (dS m <sup>-1</sup> )	0,12	0,20	0,11	0,08
Carbonatos (% caliza)	lp	0,85	0,50	0,41
Materia Org. (%)	2,29	1,51	5,33	4,17
N total (%)	0,17	0,12	0,36	0,32
Relación C/N	7,84	7,31	8,52	7,60
Fósforo Olsen (mg kg <sup>-1</sup> )	61,38	16,41	20,68	29,11
CIC	Muy alto	Medio-bajo	Medio	Medio
K (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	10,19	16	24,54	22,61
Na	0,80	0,61	0,15	0,17
Ca	Muy alto	Alto	Muy bajo	Muy bajo
Mg	1,25	2,06	0,09	0,16
Fe	4,54	12,8	22,35	17,78
Mn	3,35	4,97	1,63	2,50
Zn	117,84	24,07	23,37	43,00
Cu	5,67	10,93	1,87	7,63
B	1,17	0,78	0,35	0,53
	1,26	1,07	2,76	3,04
	0,45	2,08	1,2	1,51

Tabla A.4. Historial de cultivo de fincas de origen de raíces para la obtención de microorganismos endofíticos.

Cultivo: alubia			
Código	Observaciones	Historial de cultivo	Aplicaciones de abonos orgánicos
SLB	Hace 8 años estuvo cultivado de alubia. Plantada con alubia variedad riñón	2007: remolacha 2008: cereal 2009: cereal	15 m3 de gallinaza/ha 1.500 kg/ha de carbocal
SRN	Hace 8 años estuvo cultivado de alubia. Plantada con alubia variedad palmeña	2008: patatas 2009: cereal	15 m3 de gallinaza/ha 1.500 kg/ha de carbocal
SCB	Nunca ha estado sembrada con alubia. Plantada con alubia variedad palmeña	2008: cereal 2009: cereal	16 m3 de gallinaza/ha 1.500 kg/ha de carbocal
BLQ	Ha estado durante 15 años en barbecho. No hay historial de siembras previas de alubia. Plantada con alubia variedad riñón	2009: maíz	Sin aplicaciones
BMA	Plantada con alubia variedad blanca redonda	2009: alubia	Sin aplicaciones
BCS	Hace 20 años se sembró alubia. Plantada con alubia variedad blanca dorada	2008: maíz 2009: maíz	Sin aplicaciones
VCC	No hay datos	2008: cebolla 2009: maíz	No hay datos
VCV	Hace 4 años estuvo plantada de alubia	2007: cebada 2008: remolacha	No hay datos

Tabla A.4. Historial de cultivo de fincas de origen de raíces para la obtención de microorganismos endofíticos. (Continuación).

<b>Cultivo: Pimiento</b>			
<b>Código</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Historial de cultivo</b>	<b>Aplicaciones de abonos orgánicos</b>
PPSA	Hace 6 años estuvo sembrada con maíz.	2007: maíz 2008: remolacha 2009: maíz	Rastrojo de cosecha anterior
PPSB	Hace 6 años estuvo sembrada con maíz.	2007: maíz 2008: remolacha 2009: maíz	Rastrojo de cosecha anterior
PPSC	Hace 6 años estuvo sembrada con maíz.	2007: maíz 2008: remolacha 2009: maíz	Rastrojo de cosecha anterior
RVPA	No hay datos	No hay datos	No hay datos
RVPB	No hay datos	No hay datos	No hay datos
RVSV	No hay datos	No hay datos	No hay datos
FCA	No hay datos	Ultimos tres años sembradas con pimiento	Finca abonada con Trichoderma desde hace 4 años
FCB	No hay datos	Ultimos tres años sembradas con pimiento	Finca abonada con Trichoderma desde hace 4 años
FVA	No hay datos	Ultimos tres años sembradas con pimiento	Finca abonada con Trichoderma desde hace 4 años
SCFA	No hay datos	2007: patatas 2008: maíz 2009: maíz	Estiercol de oveja
SCFB	No hay datos	2007: patatas 2008: maíz 2009: maíz	Estiercol de oveja
SCFC	No hay datos	2007: patatas 2008: maíz 2009: maíz	Estiercol de oveja
SCE	No hay datos	5 años sembrada de maíz	No hay datos
MTA	Hace 6 años estuvo sembrada de pimiento	2008: maíz 2009: maíz	Estiércol
MMM	Hace 3 años estuvo sembrada de pimiento	2008: trigo 2009: trigo	Estiércol de oveja
MJC	Estuvo sembrada de pimiento hace 5 años	2008: maíz 2009: remolacha	Estiércol

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León.

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Diámetro del halo (mm)	Sideróforos		Solubilizadores de fosfato	Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
					Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporu m f.sp. phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
5	Sueros de Cepeda	SRN 2-3	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,18	2	5,68	2	0,06	0,01	0,14	3	n.c	n.c
7	Sueros de Cepeda	SRN 3-1	A	9	++	2	n.s	1,82	1	121,17	3(9)	1,38	0,02	0,02	1	n.c	n.c
8	Sueros de Cepeda	SRN 3-2	A	n.p	n.p	n.p	X	3,03	3	5,41	2	0,03	0,03	0,76	3(2)	n.c	n.c
11	Sueros de Cepeda	SLB 2-1	A	n.p	n.p	n.p	X	2,59	2	8,51	2	0,33	0,10	0,31	3	n.c	n.c
12	Sueros de Cepeda	SLB 2-2	A	12	+++	3	X	4,75	3	6,71	2	1,17	0,01	0,01	1	n.c	n.c
13	Sueros de Cepeda	SLB 2-3	A	11	+++	3	n.s	2,30	2	5,38	2	0,20	0,00	0,02	1	n.c	n.c
14	Sueros de Cepeda	SLB 2-4	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,37	2	2,45	1	0,49	0,03	0,05	2	n.c	n.c
15	Sueros de Cepeda	SLB 3-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s	3,19	3	7,33	2	0,42	0,30	0,71	3(3)	n.c	n.c
16	Sueros de Cepeda	SLB 3-2	A	n.p	n.p	n.p	n.s	3,15	3	131,41	3(8)	0,87	0,60	0,69	3(5)	n.c	n.c
17	Sueros de Cepeda	SCB 1-1	A	7	++	2	X	7,12	3(9)	20,28	3	0,61	0,00	0,01	1	n.c	n.c
18	Sueros de Cepeda	SCB 1-2	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,15	2	10,35	2	0,02	0,00	0,00	1	n.c	n.c
19	Sueros de Cepeda	SCB 1-3	A	8	++	2	n.s	2,81	2	0,67	1	0,32	0,00	0,00	1	n.c	n.c
20	Sueros de Cepeda	SCB 2-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,11	2	61,39	3	0,22	0,03	0,13	3	n.c	n.c
21	Sueros de Cepeda	SCB 2-2	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,49	2	32,68	3	0,23	0,00	0,02	1	n.c	n.c

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Sideróforos			Solubilizadores de fosfato		Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
				Diámetro del halo (mm)	Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)	
22	Sueros de Cepeda	SCB 2-3	A	n.p	n.p	n.p	n.s	4,40	3	39,74	3	0,03	0,00	0,11	3	n.c	n.c	
26	Sueros de Cepeda	SCB 4-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,19	2	4,93	1	0,03	0,01	0,23	3	n.c	n.c	
27	Bercianos del Páramo	BSC 1-1	A	4	+	1	n.s	8,65	3(5)	17,86	3	0,83	0,02	0,02	1	n.c	n.c	
28	Bercianos del Páramo	BSC 1-2	A	n.p	n.p	n.p	n.s	1,97	2	17,25	3	0,31	0,14	0,44	3(9)	n.c	n.c	
39	Bercianos del Páramo	BMA 1-2	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,46	2	0,91	1	0,36	0,04	0,12	3	n.c	n.c	
43	Bercianos del Páramo	BMA 2-3	A	8	++	2	n.s	3,07	3	5,00	2	0,23	0,08	0,34	3	n.c	n.c	
45	Bercianos del Páramo	BMA 3-2	A	8	++	2	n.s	1,77	1	11,37	2	0,23	0,04	0,17	3	n.c	n.c	
46	Bercianos del Páramo	BMA 3-3	A	n.p	n.p	n.p	n.s	1,97	2	1,20	1	0,03	0,00	0,03	1	n.c	n.c	
48	Bercianos del Páramo	BLQ 1-2	A	n.p	n.p	n.p	X	2,06	2	0,43	1	0,17	0,02	0,10	3	n.c	n.c	
50	Bercianos del Páramo	BLQ 2-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s	1,57	1	2,12	1	0,85	0,18	0,21	3	n.c	n.c	
51	Bercianos del Páramo	BLQ 2-2	A	4	+	1	n.s	3,48	3	51,75	3	1,25	0,13	0,10	3	n.c	n.c	
53	Bercianos del Páramo	BLQ 3-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s	3,25	3	11,72	2	1,22	0,14	0,12	3	n.c	n.c	
54	Bercianos del Páramo	BLQ 3-2	A	n.p	n.p	n.p	n.s	3,86	3	0,28	1	0,83	0,04	0,05	2	n.c	3,00	
60	Pobladura de Pelayo García	PPSA 2-3	A	n.p	n.p	n.p	n.s	,69	1	23,63	3	0,75	0,07	0,10	2	n.c	4,33	

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Sideróforos			Solubilizadores de fosfato		Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
				Diámetro del halo (mm)	Evaluación	Equivalencia	Evaluación		$\mu\text{g } 10^{-8}$ UFC	Tercil	$\mu\text{mol ACC mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
61	Pobladura de Pelayo García	PPSA 3-1	A	9	++	2	n.s		1,17	1	5,57	2	0,86	0,03	0,03	1	n.c	n.c
64	Pobladura de Pelayo García	PPSB 1-1	A	4	+	1	n.s		5,79	3	7,44	2	0,69	0,04	0,06	2	n.c	n.c
66	Pobladura de Pelayo García	PPSB 2-2	A	3	+	1	X		10,10	3(4)	7,13	2	0,77	0,03	0,04	1	n.c	n.c
67	Pobladura de Pelayo García	PPSB 2-3	A	n.p	n.p	n.p	X		8,63	3(6)	1,75	1	0,48	0,22	0,45	3(7)	n.c	n.c
70	Pobladura de Pelayo García	PPSC 1-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s		7,42	3(8)	18,84	3	0,28	0,12	0,43	3(10)	n.c	n.c
72	Pobladura de Pelayo García	PPSC 1-3	A	4	+	1	n.s		6,94	3(10)	1,14	1	0,80	0,02	0,02	1	n.c	n.c
74	Pobladura de Pelayo García	PPSC 2-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s		2,03	2	0,60	1	0,66	0,06	0,10	3	n.c	n.c
75	Pobladura de Pelayo García	PPSC 2-2	A	4	+	1	n.s		4,41	3	8,25	2	0,81	0,01	0,01	1	n.c	n.c
76	Pobladura de Pelayo García	PPSC 3-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s		3,63	3	13,69	2	0,27	0,08	0,29	3	n.c	n.c
80	Pobladura de Pelayo García	PPSC 3-5	A	n.p	n.p	n.p	n.s		4,05	3	2,39	1	0,21	0,06	0,29	3	n.c	n.c
82	Villaornate	VCC 1-2	A	4	+	1	n.s		4,05	3	12,66	2	0,83	0,06	0,08	2	n.c	n.c
83	Villaornate	VCC 1-3	A	n.p	n.p	n.p	X		2,98	3	39,37	3	0,25	0,06	0,25	3	n.c	n.c

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Diámetro del halo (mm)	Sideróforos		Solubilizadores de fosfato	Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
					Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
84	Villaornate	VCC 1-4	A	11	+++	3	X	2,84	2	1,69	1	0,12	0,02	0,17	3	n.c	n.c
85	Villaornate	VCC 2-1	A	10	++	2	n.s	3,67	3	2,48	1	0,96	0,03	0,03	1	n.c	n.c
90	Villaornate	VCC 3-3	A	8	++	2	X	3,16	3	449,81	3(1)	0,88	0,04	0,05	2	4,00	8,67
91	Villaornate	VCC 3-5	A	9	++	2	n.s	1,27	1	52,67	3	0,17	0,04	0,23	3	n.c	n.c
95	Villaornate	VCV 1-4	A	n.p	n.p	n.p	n.s	1,97	2	13,98	2	0,49	0,05	0,11	3	n.c	n.c
96	Villaornate	VCV 1-5	A	11	+++	3	n.s	0,86	1	10,71	2	0,29	0,05	0,17	3	n.c	n.c
99	Villaornate	VCV 3-1	A	11	+++	3	X	8,41	3(7)	17,21	3	0,70	0,00	0,00	1	n.c	n.c
100	Villaornate	VCV 3-2	A	16	+++	3	n.s	6,05	3	178,85	3(7)	0,38	0,03	0,09	2	3,33	9,33
101	Villaornate	VCV 3-3	A	12	+++	3	X	4,15	3	8,31	2	0,56	0,03	0,05	2	n.c	n.c
102	Riego de la Vega	RVPA 1-1	A	n.p	n.p	n.p	n.s	2,33	2	66,61	3	0,77	0,01	0,01	1	n.c	n.c
103	Riego de la Vega	RVPA 1-2	A	4	+	1	n.s	4,53	3	0,39	1	0,13	0,01	0,07	2	n.c	n.c
104	Riego de la Vega	RVPA 1-3	A	n.p	n.p	n.p	n.s	,75	1	12,17	2	1,03	0,09	0,09	2	n.c	n.c
105	Riego de la Vega	RVPA 1-4	A	4	+	1	n.s	2,27	2	17,03	3	0,68	0,01	0,02	1	3,67	n.c
106	Riego de la Vega	RVPA 2-1	A	6	++	2	n.s	1,20	1	7,68	2	0,21	0,06	0,29	3	n.c	n.c
110	Riego de la Vega	RVPA 3-1	A	3	+	1	n.s	6,78	3	6,83	2	0,89	0,10	0,11	3	n.c	n.c
112	Riego de la Vega	RVPB 1-1	A	3	+	1	X	0,73	1	22,26	3	0,02	0,01	0,41	3	n.c	n.c
113	Riego de la Vega	RVPB 1-2	A	4	+	1	X	10,73	3(2)	30,77	3	0,87	0,02	0,03	1	n.c	n.c
114	Riego de la Vega	RVPB 2-1	A	4	+	1	X	1,41	1	8,92	2	0,03	0,00	0,08	2	n.c	n.c
115	Riego de la Vega	RVPB 2-2	A	9	++	2	X	2,90	3	259,21	3(5)	0,50	0,00	0,01	1	6,00	11,00
116	Riego de la Vega	RVPB 2-3	A	n.p	n.p	n.p	X	2,31	2	7,27	2	0,05	0,01	0,31	3	n.c	n.c
118	Riego de la Vega	RVPB 3-2	A	4	+	1	n.s	10,28	3(3)	10,61	2	0,86	0,02	0,03	1	n.c	n.c

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Diámetro del halo (mm)	Sideróforos		Solubilizadores de fosfato	Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
					Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
119	Riego de la Vega	RVPB 3-3	A	n.p	n.p	n.p	n.s	11,41	3(1)	12,44	2	0,96	0,03	0,04	1	n.c	n.c
120	Riego de la Vega	RVSV 1-1	A	4	+	1	n.s	1,94	2	3,42	1	0,87	0,02	0,02	1	n.c	n.c
121	Riego de la Vega	RVSV 1-2	A	14	+++	3	n.s	1,34	1	330,29	3(4)	0,71	0,01	0,01	1	10,33	12,00
122	Riego de la Vega	RVSV 1-3	A	12	+++	3	n.s	3,03	3	386,05	3(2)	0,75	0,05	0,07	2	12,00	11,33
123	Riego de la Vega	RVSV 1-4	A	n.p	n.p	n.p	n.s	1,60	1	7,34	2	0,03	0,03	0,78	3(1)	n.c	n.c
124	Riego de la Vega	RVSV 1-5	A	4	+	1	n.s	4,59	3	374,85	3(3)	0,86	0,00	0,00	1	12,67	12,33
129	Riego de la Vega	RVSV 3-3	A	n.p	n.p	n.p	X	1,44	1	5,99	2	0,26	0,03	0,14	3	n.c	n.c
132	Fresno de la Vega	FCA 1-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,97	2	4,11	1	1,42	0,07	0,05	2	n.c	n.c
138	Fresno de la Vega	FCA 2-5	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,05	2	0,36	1	0,06	0,03	0,45	3(8)	n.c	n.c
141	Fresno de la Vega	FCB 2	P	11	+++	3	n.s	3,61	3	1,45	1	0,50	0,03	0,06	2	n.c	n.c
145	Fresno de la Vega	FVA 1-1	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,78	1	11,74	2	0,30	0,03	0,10	3	n.c	n.c
146	Fresno de la Vega	FVA 1-2	P	9	++	2	n.s	5,70	3	247,14	3(6)	0,81	0,04	0,05	2	n.c	n.c
147	Fresno de la Vega	FVA 1-3	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,75	1	7,58	2	0,63	0,01	0,01	1	n.c	n.c
149	Fresno de la Vega	FVA 1-5	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,73	1	14,59	2	0,92	0,05	0,05	2	n.c	2,33
150	Fresno de la Vega	FVA 2-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,72	1	15,49	2	0,98	0,04	0,04	1	n.c	n.c
151	Fresno de la Vega	FVA 2-3	P	4	+	1	n.s	2,61	2	3,36	1	0,23	0,07	0,30	3	n.c	1,00

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castillas y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Diámetro del halo (mm)	Sideróforos		Solubilizadores de fosfato	Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
					Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
152	Fresno de la Vega	FVA 2-4	P	8	++	2	n.s	1,57	1	4,04	1	0,39	0,08	0,22	3	n.c	n.c
153	Fresno de la Vega	FVA 3-1	P	4	+	1	n.s	1,25	1	4,72	1	1,15	0,05	0,04	2	n.c	n.c
154	Fresno de la Vega	FVA 3-2	P	4	+	1	n.s	1,68	1	75,28	3	0,72	0,06	0,08	2	n.c	n.c
159	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 1-1	P	3	+	1	n.s	3,00	3	2,04	1	1,27	0,10	0,08	2	n.c	n.c
160	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 1-2	P	4	+	1	n.s	1,92	2	0,30	1	0,67	0,03	0,04	1	1,67	n.c
161	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 2-1	P	4	+	1	n.s	3,38	3	3,53	1	0,58	0,05	0,08	2	n.c	n.c
162	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 2-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,73	1	4,10	1	0,08	0,05	0,58	3(6)	n.c	n.c
163	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 2-3	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,14	2	9,45	2	0,77	0,03	0,04	1	n.c	n.c
164	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 3-1	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,95	2	102,55	3(10)	0,70	0,06	0,08	2	n.c	n.c
165	San Cristóbal de Entreviñas	SCFA 3-2	P	4	+	1	n.s	2,63	2	4,60	1	0,61	0,03	0,05	2	n.c	n.c
166	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 1-1	P	4	++	2	n.s	5,88	3	2,46	1	0,03	0,02	0,70	3(4)	n.c	n.c
169	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 2-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,58	1	33,41	3	0,69	0,05	0,07	2	4,00	n.c
170	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 2-3	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,46	2	4,94	1	0,87	0,06	0,07	2	n.c	n.c
172	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 2-5	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,37	2	5,99	2	1,21	0,01	0,01	1	n.c	n.c

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castilla y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Diámetro del halo (mm)	Sideróforos		Solubilizadores de fosfato	Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
					Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
173	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 3-1	P	12	***	3	n.s	2,77	2	6,63	2	0,46	0,01	0,03	1	2,33	n.c
174	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 3-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,63	1	73,06	3	0,82	0,03	0,04	2	n.c	n.c
175	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 3-3	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,40	2	78,42	3	0,80	0,04	0,05	2	n.c	n.c
176	San Cristóbal de Entreviñas	SCFB 3-4	P	4	+	1	n.s	2,35	2	8,35	2	0,60	0,02	0,04	1	3,67	n.c
177	San Cristóbal de Entreviñas	SCFC 1-1	P	12	+++	3	n.s	2,10	2	10,44	2	0,64	0,03	0,04	1	n.c	n.c
178	San Cristóbal de Entreviñas	SCFC 1-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,94	2	7,27	2	0,67	0,02	0,03	1	n.c	1,00
180	San Cristóbal de Entreviñas	SCFC 2-1	P	11	+++	3	n.s	1,68	1	3,03	1	0,42	0,06	0,14	3	n.c	n.c
181	San Cristóbal de Entreviñas	SCFC 2-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,59	1	23,07	3	0,35	0,05	0,14	3	n.c	2,33
184	San Cristóbal de Entreviñas	SCE 1-1	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,95	3	1,60	1	0,72	0,05	0,07	2	n.c	n.c
185	San Cristóbal de Entreviñas	SCE 1-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	3,44	3	2,79	1	0,57	0,03	0,05	2	n.c	n.c
188	San Cristóbal de Entreviñas	SCE 2-1	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,76	1	35,79	3	0,69	0,03	0,04	1	n.c	n.c
190	San Cristóbal de Entreviñas	SCE 3-1	P	4	+	1	n.s	1,84	1	22,86	3	0,65	0,05	0,07	2	n.c	n.c
192	San Cristóbal de Entreviñas	SCE 3-4	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,92	2	17,20	3	0,64	0,02	0,03	1	2,00	n.c

Tabla A.5. Resultado de las pruebas PGPR y biocontrol *in vitro* para los cepas de rizobacterias endofíticas aisladas de alubia y pimiento en Castillas y León (Continuación).

Nº	Origen de la cepa	Código	Cultivo	Diámetro del halo (mm)	Sideróforos		Solubilizadores de fosfato	Producción de IAA		Actividad ACC desaminasa		Crecimiento en medio libre de N				Biocontrol <i>in vitro</i>	
					Evaluación	Equivalencia	Evaluación	µg 10 <sup>-8</sup> UFC	Tercil	µmol ACC mg prot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Tercil	Con N (OD)	Sin N (OD)	Índice (OD)	Tercil	Radio halo <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (mm)	Radio halo <i>P. capsici</i> (mm)
193	Micereses	MTA 1-1	P	4	+	1	n.s	2,19	2	3,45	1	0,88	0,04	0,04	2	n.c	n.c
194	Micereses	MTA 1-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,36	1	5,82	2	1,30	0,07	0,06	2	5,00	n.c
195	Micereses	MTA 1-3	P	7	++	2	n.s	1,65	1	4,37	1	1,06	0,01	0,01	1	3,33	n.c
197	Micereses	MTA 2-1	P	5	++	2	n.s	2,42	2	32,54	3	0,87	0,01	0,02	1	n.c	n.c
198	Micereses	MTA 2-2	P	4	+	1	n.s	1,90	2	1,52	1	0,83	0,06	0,07	2	n.c	n.c
199	Micereses	MTA 2-3	P	4	+	1	n.s	1,88	1	7,25	2	0,58	0,03	0,05	2	n.c	n.c
201	Micereses	MTA 3-2	P	3	+	1	n.s	2,01	2	11,60	2	0,73	0,03	0,04	2	n.c	n.c
202	Micereses	MTA 3-3	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,49	1	1,53	1	1,22	0,05	0,04	2	n.c	n.c
204	Micereses	MMM 1-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,84	1	16,60	3	0,67	0,01	0,02	1	n.c	n.c
207	Micereses	MMM 1-5	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,83	1	1,30	1	1,51	0,05	0,04	1	n.c	n.c
208	Micereses	MMM 1-6	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,75	1	1,16	1	0,76	0,02	0,02	1	n.c	n.c
209	Micereses	MMM 2-1	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,89	1	0,59	1	0,76	0,05	0,07	2	n.c	2,00
213	Micereses	MMM 3-2	P	n.p	n.p	n.p	n.s	2,10	2	25,42	3	1,15	0,08	0,07	2	n.c	n.c
214	Micereses	MMM 3-3	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,49	1	3,99	1	1,26	0,07	0,06	2	n.c	n.c
215	Micereses	MMM 3-4	P	8	++	2	n.s	1,61	1	93,16	3	0,67	0,06	0,08	2	2,00	n.c
216	Micereses	MMM 3-5	P	4	+	1	X	1,30	1	0,20	1	1,41	0,09	0,07	2	n.c	n.c
217	Micereses	MMM 3-6	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,76	1	51,37	3	1,32	0,07	0,05	2	n.c	n.c
219	Micereses	MJC 2-1	P	n.p	n.p	n.p	n.s	1,66	1	26,77	3	1,46	0,06	0,04	1	n.c	n.c