

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Estructura de la comunidad fúngica en  
suelos cultivados bajo invernadero de las  
provincias de Almería y Granada, y su  
relación con el contenido en materia  
orgánica

**Curso 2014/2015**

**Alumno/a:** Mario Hurtado Milla

**Director/es:**  
Julio C. Tello Marquina  
Jose Ignacio Marín Guirao



## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis padres, por todo el apoyo que me han dado, tanto en las decisiones que he tomado como en los momentos más complicados, estoy muy orgulloso de ellos.

En segundo lugar querría agradecer a Julio C. Tello Marquina todo su trabajo realizado, toda su labor académica, en la cual he aprendido mucho, siendo el único profesor que me ha enseñado a pensar, ver las cosas desde diferentes puntos de vista y no como suele regirse o decirse. Desde luego ha sido el mejor profesor que he tenido.

Y por supuesto, dar las gracias a Jose Ignacio Marín Guirao. Sin él nada de esto habría sido posible, él me ha enseñado, pacientemente, como moldear este trabajo, como incarle el diente. Él ha sido el partícipe de querer sumergirme en este microcosmos del suelo y quedar fascinado con sus explicaciones sobre la ``caja negra'' de la que tanto hemos hablado y tan buenos momentos hemos pasado. Muchas Gracias.

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>1.- INTERÉS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.- INTERÉS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.- OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.- CLASIFICACIÓN DE LA COMUNIDAD FÚNGICA DEL SUELO .....</b>	<b>18</b>
2.1.1.- SAPROFITISMO DE LA COMUNIDAD FÚNGICA DEL SUELO .....	22
2.1.2.- COLONIZACIÓN COMPETITIVA SAPROFÍTICA DE LOS SUSTRATOS .....	23
<b>2.2.- PRINCIPALES GÉNEROS FÚNGICOS DE LOS SUELOS DEL SURESTE ESPAÑOL .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.- TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA COMUNIDAD FÚNGICA DEL SUELO .....</b>	<b>31</b>
2.3.1.- TÉCNICAS ANALÍTICAS DEPENDIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO.....	34
2.3.1.1.- Técnica de las diluciones sucesivas en agua estéril .....	35
2.3.1.2.- Técnica del suelo en placa o de la adición del suelo al medio de cultivo fundido.....	37
2.3.1.3.- Método de Cambridge y técnica para evaluar el potencial infeccioso de los suelos ...	38
2.3.1.4.- Fitopatometría de suelos .....	39
2.3.2.- TÉCNICAS ANALÍTICAS NO DEPENDIENTES DE MEDIOS DE CULTIVO .....	40
2.3.2.1.- Técnicas con ácidos nucleicos (Metagenómica) .....	41
2.3.2.2.- Análisis de ácidos grasos fosfolípidos .....	43
2.3.2.3.- Técnicas filogenéticas .....	43
2.3.2.4.- Hibridación fluorescente in situ (FISH) .....	44
2.3.3.- TÉCNICAS DE MUESTREO PARA ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO .....	45
<b>2.4.- COMPOSICIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO .....</b>	<b>47</b>
2.4.1.- INTRODUCCIÓN .....	47
2.4.2.- CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS .....	51
2.4.2.1.- Ácidos húmicos .....	54
2.4.2.2.- Ácidos fúlvicos.....	56
2.4.2.3.- Huminas .....	57
2.4.3.- EFECTO DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS EN LA ESTRUCTURA EDÁFICA .....	58
2.4.3.1.- Efecto en las propiedades físicas .....	59
2.4.3.2.- Efectos en las propiedades químicas .....	61
2.4.3.3.- Efectos en las propiedades biológicas .....	66
<b>2.5.- INFLUENCIA DE LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LA COMUNIDAD FÚNGICA DEL SUELO .....</b>	<b>69</b>
<b>2.6.- ÍNDICES DE DIVERSIDAD DE ESPECIES FÚNGICAS EN EL HÁBITAT EDÁFICO .....</b>	<b>72</b>
2.6.1.- ÍNDICE DE MARGALEF (1958).....	74
2.6.2.- ÍNDICE DE SIMPSON (1949) .....	74
2.6.3.- ÍNDICE DE SHANNON-WIENER (1949) .....	75
2.6.4.- ÍNDICE DE PIELOU (1969) .....	75
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>76</b>

<b>3.1.- CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACIÓN DE LOS INVERNADEROS MUESTREADOS .....</b>	<b>76</b>
3.1.1.- ZONA DE ZÚJAR (GRANADA).....	77
3.1.2.- ZONA DE FORNES (GRANADA) .....	78
3.1.3.- ZONA COSTA (CARCHUNA-MOTRIL. GRANADA).....	80
<b>3.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA DE LOS SUELOS .....</b>	<b>84</b>
<b>3.3.- ESTUDIO DE LA COMUNIDAD FÚNGICA DEL SUELO .....</b>	<b>86</b>
3.3.1.- MUESTREO .....	86
3.3.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO .....	87
3.3.3.- ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD FÚNGICA TOTAL .....	89
<b>3.4.- CÁLCULO DE ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD .....</b>	<b>92</b>
<b>3.5.- ANÁLISIS DE DATOS.....</b>	<b>93</b>
<b><u>4.- RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b>1.- PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA DE LOS SUELOS.....</b>	<b>95</b>
<b>2.- GÉNEROS FÚNGICOS PRESENTES EN LOS SUELOS .....</b>	<b>95</b>
<b>3.- ÍNDICES DE DIVERSIDAD DE LOS SUELOS.....</b>	<b>100</b>
<b>4.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>101</b>
4.1.- ANÁLISIS UNIVARIANTES Y BIVARIANTES CLÁSICOS CON LOS DISTINTOS PARÁMETROS E ÍNDICES CLÁSICOS. .....	101
4.1.1.- Correlaciones de Pearson .....	101
4.1.2.- Análisis ANOVA/t-Student: .....	102
4.2.- ANÁLISIS MULTIVARIANTES QUE CONSIDERAN TANTAS VARIANTES COMO GÉNEROS FÚNGICOS IDENTIFICADOS EN LOS SUELOS ANALIZADOS. ....	106
4.2.1.- Zona de procedencia.....	106
4.2.2.- Tipo de Cultivo .....	114
4.2.3.- Contenido en Porcentaje de materia orgánica. ....	118
<b><u>5.- DISCUSIÓN .....</u></b>	<b><u>128</u></b>
<b><u>6.- CONCLUSIÓN .....</u></b>	<b><u>132</u></b>
<b><u>7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>133</u></b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolución rendimientos agrícolas. <b>Fuente:</b> FAO.....	1
<b>Figura 2:</b> Evolución de personas en inseguridad alimentaria. <b>Fuente:</b> FAO.....	2
<b>Figura 3:</b> Protocolo general de análisis del metagenoma de una muestra de suelo. <b>Fuente:</b> Hernández-León <i>et al.</i> (2010).....	38
<b>Figura 4:</b> Esquema de humificación por neoformación. <b>Fuente:</b> (Duchaufour, 1987); (Labrador, 1996).....	47
<b>Figura 5:</b> Esquema de formación de sustancias húmicas. <b>Fuente:</b> (Labrador, 1996).....	48
<b>Figura 6:</b> Fraccionamiento de la materia orgánica por métodos analíticos clásicos. <b>Fuente:</b> (Labrador 1996).....	50
<b>Figura 7:</b> Esquema de la dinámica de los ciclos de nutrientes. <b>Fuente:</b> White (1987); (Labrador, 1996).....	55
<b>Figura 8:</b> Detalle cultivo de mostaza post-aporte.....	73
<b>Figura 9:</b> Detalle invernadero de pepino con aporte de materia orgánica.....	77
<b>Figura 10:</b> Detalle de la estructura y estado del suelo del invernadero 3.1.....	79
<b>Figura 11:</b> Detalle del muestreo de un invernadero con aporte de materia orgánica.....	83
<b>Figura 12:</b> Detalle secado de muestras en laboratorio.....	83
<b>Figura 13:</b> Detalle del proceso de triturado con mortero de porcelana.....	84
<b>Figura 14 y 15:</b> Detalles del proceso de tamizado de muestras.....	84
<b>Figura 16:</b> Detalle preparación diluciones sucesivas.....	85
<b>Figura 17:</b> Detalle proceso diluciones sucesivas.....	86

<b>Figura 18:</b> Detalle medio de cultivo (agar-malta).....	86
<b>Figura 19:</b> Detalle proceso incubación en laboratorio.....	87
<b>Figura 20:</b> Detalle de cuatro colonias de <i>Aspergillus</i> .....	87
<b>Figura 21:</b> Detalle de <i>Aspergillus</i> al microscopio.....	88

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Caracterización de los hongos por su capacidad saprofitaria para competir por los sustratos (Garret, 1970). <b>Fuente:</b> Martínez <i>et al.</i> 2009.....	21
<b>Tabla 2.</b> Efecto de la dilución en talco sobre el número de colonias (U.F.C) de <i>Fusarium</i> (Rodríguez Molina, 1996). <b>Fuente:</b> Martínez <i>et al.</i> 2009.....	28
<b>Tabla 3.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento en el número de U.F.C. /g de suelo en <i>Fusarium</i> (Rodríguez Molina, 1996). <b>Fuente:</b> Martínez <i>et al.</i> 2009.....	29
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la tanda de análisis, sobre el número estimado de U.F.C. /g de suelo en <i>Fusarium</i> (Rodríguez Molina, 1996). <b>Fuente:</b> Martínez <i>et al.</i> 2009.....	29
<b>Tabla 5:</b> Origen de las colonias fúngicas que se desarrollaron en el análisis de 10 muestras de un suelo con trigo.....	32
<b>Tabla 6.</b> Distribución de los hongos más abundantes en los campos de trigo. Comparación de los métodos de dilución en placas (adición del suelo al medio fundido) y del suelo depositado en la superficie del medio agarizado sólido (suelo en placas).....	34
<b>Tabla 7:</b> Efectos más destacados de la materia orgánica en suelos cultivados. <b>Fuente:</b> Urbano Terrón (1987); (Labrador, 1996).....	65
<b>Tabla 8:</b> Distribución del total de las muestras analizadas con su correspondencia en zona (Zújar, Costa y Fornes) y tipo de cultivo (Tomate o Pepino).....	72
<b>Tabla 9:</b> Porcentaje de materia orgánica del total de las 44 muestras recogidas en las zonas de Fornes, Zújar y Costa, obtenido mediante el método Walkley y Black (1934).....	91

<b>Tabla 10:</b> Microbiota fúngica identificada en las muestras de suelo recogidas (Tello <i>et al.</i> , 1990.....	92
<b>Tabla 11:</b> Valores del cálculo de los índices de diversidad de Margalef (d), Pielou (J'), Shannon-Weinner (H') y Simpson (1-Lambda), así como el número total de géneros (S) y el número total de individuos (N).....	96
<b>Tabla 12:</b> Análisis de las correlaciones de Pearson entre el porcentaje en materia orgánica de los suelos (% M.O.) y el número total de géneros (S), número total de individuos (N), Índice de riqueza de Margalef (d), de equitatividad de Pielou (J), de diversidad de Shannon (H) y de diversidad de Simpson (1-λ).....	98
<b>Tabla 13:</b> Parámetros relacionados con la diversidad fúngica de los suelos estudiados en función de los factores zona, % de materia orgánica y tipo de cultivo en factores de la microbiota fúngica del suelo, (N (total de individuos), S (Total de géneros), d (Riqueza de Margalef), J (Equitatividad de Pielou), H (diversidad de Shannon) y 1-λ (Diversidad de Simpson)).....	99
<b>Tabla 14:</b> Análisis ANOSIM entre las diferentes zonas constituyentes del factor Zona con un p-valor global del 0.1% obtenido mediante 999 permutaciones y un valor global de R= 0.24.....	104
<b>Tabla 15:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Zújar, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	105
<b>Tabla 16:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Fornes, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	105
<b>Tabla 17:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Costa, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	106
<b>Tabla 18:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre las zonas Zújar y Costa en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	107

<b>Tabla 19:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre las zonas Zújar y Fornes en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	108
<b>Tabla 20:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre las zonas Costa y Fornes en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	109
<b>Tabla 21:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Tipo de cultivo, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	111
<b>Tabla 22:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Tipo de cultivo, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	112
<b>Tabla 23:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los Tipo de cultivo Tomate y Pepino en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	113
<b>Tabla 24:</b> Análisis ANOSIM entre los diferentes grupos de porcentaje de materia orgánica un p-valor global del 0.1% obtenido mediante 999 permutaciones y un valor global de R= 0.31.....	115
<b>Tabla 25:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 4, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	115
<b>Tabla 26:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 3, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	116
<b>Tabla 27:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 2, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	117



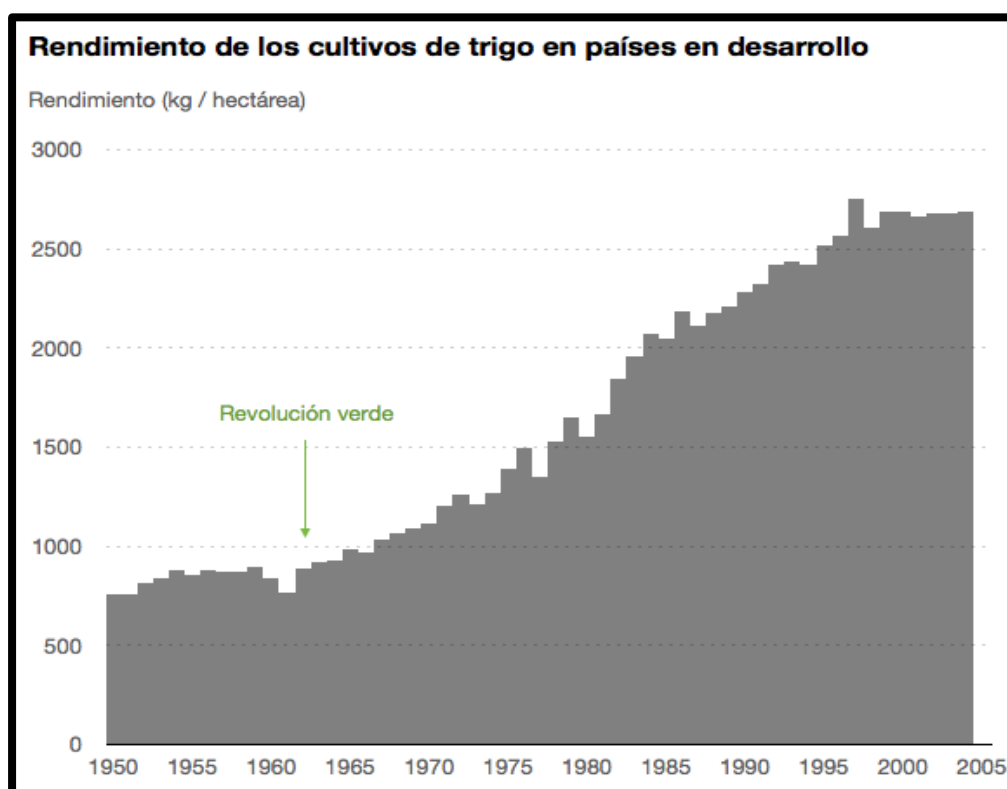
<b>Tabla 28:</b> Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 1, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.....	117
<b>Tabla 29:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 4 y 3 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	118
<b>Tabla 30:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 4 y 2 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	119
<b>Tabla 31:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 3 y 2 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	120
<b>Tabla 32:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 4 y 1 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	121
<b>Tabla 33:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 3 y 1 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	122
<b>Tabla 34:</b> Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 2 y 1 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.....	123

## 1.- Interés y objetivos

### 1.1.- Introducción

Con el inicio de la primera revolución verde se inició un proceso reconvensor en la agricultura imperante de la época. El objetivo no era más que aumentar los rendimientos agrícolas y de esta forma acabar con el hambre en el mundo.

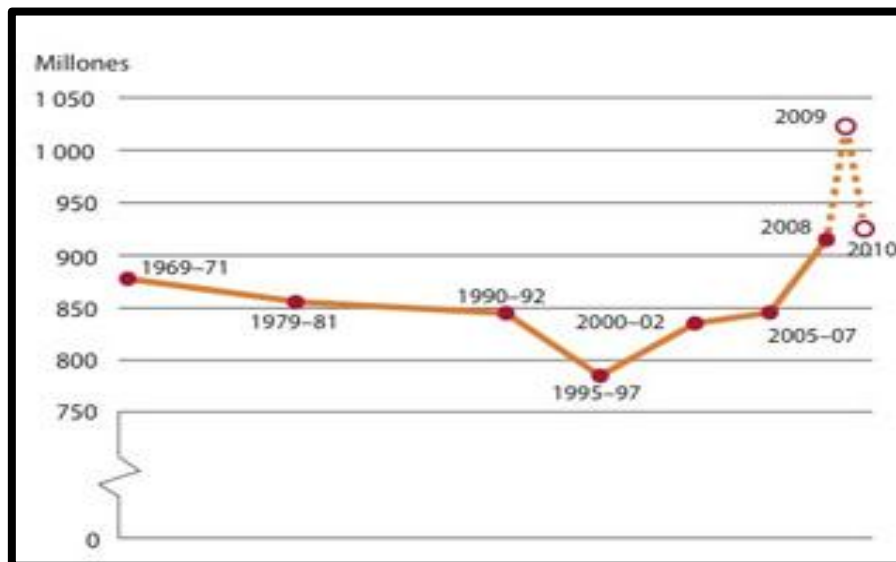
Esta reconversión agrícola trajo una nueva forma de hacer agricultura de manera más efectiva mediante el uso de determinadas sustancias inorgánicas, como fertilizantes y pesticidas, el uso de semillas modificadas, mejoradas para la obtención de mayores rendimientos, mayor resistencia a transportes de largas distancias, para de esta forma abrir un comercio mundial de alimentos en el que nadie experimentase inseguridad alimentaria.



**Figura 1:** Evolución rendimientos agrícolas. **Fuente:** FAO.

Una muestra de éste incremento en la producción de materias agrícolas se puede observar en la tendencia del gráfico correspondiente a la **Figura 1**, en el que se observa un importante ascenso en los rendimientos del trigo, segundo alimento como base alimenticia mundial. Así pasó de 800 kg/ha, rendimiento al inicio de la revolución

verde, hasta más de 2500 kg/ha, en el año 2005. Es decir, en 40 años se triplicaron los rendimientos. Al ver estas cifras es lógico pensar que el hambre en el mundo ha sido erradicada pero, desgraciadamente no es así.



**Figura 2:** Evolución de personas en inseguridad alimentaria en el mundo (1969-2010). Fuente: FAO.

La gráfica de la **Figura 2** indica una tímida tendencia a la baja que corresponde con el inicio de la revolución verde, pero tras el comienzo del siglo XXI comenzará a incrementarse el número de personas que pasan hambre, llegando a superarse la cifra de 1000 millones de personas en 2009.

Estos datos parecen interesantes dada la forma en el que se defiende el dogma del aumento de los rendimientos agrícolas. El problema no parece ser cuestión de rendimiento, si no de reparto.

Durante 50 años, mediante una agricultura que pretendía eliminar la inseguridad alimentaria, se ha experimentado una increíble extracción de nutrientes del suelo produciendo una serie de consecuencias nocivas para los ecosistemas agrícolas. Según la FAO, la mayoría de los efectos que deterioran el suelo se achacan a malas prácticas agrícolas.

Estas consecuencias adversas asociadas a las prácticas agrícolas que imperan en la actualidad se traducen en conceptos tales como la erosión, derivados del uso de

herbicidas y a la aplicación del laboreo, lo que ha desencadenado, de una forma mordaz, descensos en los rendimientos (Gómez, 2014; Carter, 1992; Hussain, 1999).

Otro efecto que se puede añadir, de la misma forma, a la agricultura moderna, es la compactación del suelo, fenómeno que genera modificaciones en el suelo, principalmente en su fertilidad física. Se estima que la extensión de tierra compactada en todo el mundo es de unos sesenta y ocho millones de hectáreas, principalmente asociadas a las prácticas de laboreo (Flowers y Lal, 1998). Problemas similares relacionados con la compactación del suelo han sido reportados en casi todos los continentes: Australia (Hamza y Anderson, 2003); Azerbaiyán (Aliev, 2001); Japón (Ohtomo y Tan, 2001); Rusia (Bondarev y Kuznetsova, 1999); Francia (Tardieu, 1994); China (Suhayda et al, 1997); Etiopía (Mwendera y Saleem, 1997) y Nueva Zelanda (Russell *et al*, 2001). Esta compactación del suelo produce un deterioro en la fertilidad del suelo afectando al almacenamiento y suministro de agua y nutrientes, mediante el aumento de la densidad aparente del suelo, disminuyendo la porosidad, lo que aporta resistencia al suelo, la disminución de la infiltración de agua en el suelo y su capacidad de retención. Estos efectos adversos reducen la eficiencia de los fertilizantes y el rendimiento del cultivo, aumentando así la escorrentía y la erosión de los suelos con problemas de contaminación ambiental indeseables (Hamza y Anderson 2005).

También se asocia con la fatiga del suelo (tierras cansadas) (Tello *et al*, 2011), traducido en una "pérdida de los rendimientos, enanismo de las plantas, amarillos, retraso en el desarrollo, etc" (Tello *et al*, 2011), a pesar del uso de productos fertilizantes y pesticidas. Según Scotto la Massesse (1983) la fatiga de los suelos se define como la reducción del desarrollo de ciertos cultivos cuando éstos se repiten, dos o más veces, en ciertos suelos y cuyo origen queda aún por explicar (Tello *et al*, 2011). Existe gran diversidad de definiciones, dada la complejidad que exige el sistema suelo, Parece ser una alteración del equilibrio en el sistema suelo-planta-microorganismos.

A su vez, el uso desmesurado de productos químicos en agricultura ha desencadenado numerosos casos de contaminación, tanto de ríos como de mares, ocasionando su eutrofización. La contaminación del suelo se refiere a otro aspecto importante en la

salud química del suelo, debido a la presencia de sustancias tóxicas. Estas se asocian con grados de insumos elevados y manejo, por ejemplo la toxicidad del cadmio relacionada a aplicaciones elevadas de fósforo y el uso excesivo de fertilizantes nitrógenados que resultan en la contaminación de las aguas subterráneas (Ongley, 1997). También procesos de salinización ocasionados, de forma general, por la manutención de sistemas de fertirrigación inadecuados.

Teniendo en cuenta todos estos efectos, puede resumirse que estos últimos 50 años de agricultura intensiva y/o extractiva, carente de sostenibilidad e incapaz de mantener un recurso no-renovable tan importante como es el suelo, base de nuestra alimentación y el cual necesita una media de 500 años para formar 1 cm de tierra fértil.

Es hora de invertir este modelo y apostar por prácticas agrícolas menos agresivas, reponiendo nutrientes al suelo en cada campaña, mediante aportes de materia orgánica, manteniendo así la dinámica de nutrientes en el suelo, así como equilibrios microbianos adecuados que dependen principalmente del sustrato nutritivo disponible, realizando rotaciones de cultivos y reduciendo el uso de productos de síntesis, creando así ecosistemas saludables, ricos en diversidad microbiana y en materia orgánica. De esta forma, comenzará a disminuir la degradación edáfica, obteniendo rendimientos similares o mejores que los de la agricultura intensiva y sin producir efectos negativos sobre el medioambiente, eliminando cualquier deuda ecológica generada en el pasado mediante el uso de malas prácticas agrícolas.

### **1.2.- Interés del estudio**

Considerando el modelo de producción intensiva de Almería, el suelo arenado (Bretones, 2003) constituye uno de los aspectos más relevantes de la horticultura almeriense. Esta técnica, ya citada en textos de la primera mitad del siglo XIV por el almeriense andalusí Ibn Luyun (Eguaras, 2014), proporciona una serie de ventajas y cualidades, en comparación con el suelo desnudo, que permitió potenciar el desarrollo hortícola a favor de una climatología benigna y de la superación de algunos factores limitantes (Bretones 2003). El arenado tradicional se caracteriza por presentar, un perfil artificial formado sobre el suelo original (tan solo cuando es necesario por

deficiencias y/o carencias del terreno), y está constituido por un horizonte permeable de suelo de cañada, un horizonte nutritivo de estiércol y un horizonte protector de arena. En el sistema de producción hortícola almeriense, el intervalo entre la realización del arenado y la necesidad de reponer la materia orgánica (denominado localmente “retranqueo”) varía en función del número de cosechas y de las alternativas o sucesión de cultivos que se hayan realizado, en este sentido, cuando se trata de cultivos de altos rendimientos como tomate, pimiento o berenjena, suele variar entre tres y cuatro años (Bretones, 2003). Hoy en día, en el campo almeriense la práctica del retranqueo se realiza en periodos más dilatados en el tiempo, e incluso se ha convertido en práctica habitual la no realización de la labor. En ese caso, es sustituida normalmente por la adición de compuestos comerciales a base de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Éstos no reportan los mismos beneficios al cultivo, puesto que entre otros aspectos, no dan lugar a la formación de agregados en el suelo ni a intercambios catiónicos duraderos, debido a que se trata de formulaciones líquidas que se pierden con el riego por lixiviación. Además, dado que los microorganismos son los principales descomponedores de la materia orgánica, las prácticas de manejo del suelo, tales como el uso de enmiendas orgánicas (*i.e.* retranqueo), pueden afectar a la actividad y la estructura de las comunidades microbianas del suelo, como es el caso de la comunidad de hongos edáficos (Larkin *et al.*, 2006).

Las interacciones planta-microorganismos-suelo juegan un papel vital en el mantenimiento de la salud y de la productividad en cultivos agrícolas y hortícolas. Por ejemplo, son numerosos los estudios que reportan la existencia de suelos que, de forma natural, se muestran supresivos a una enfermedad incluso en presencia del patógeno, hospedador sensible y condiciones ambientales favorables para su expresión (Weller, *et al.*, 2002; Bonanomi *et al.*, 2009; Penton *et al.*, 2014) Así, aunque son muchos los estudios dirigidos a la comunidad bacteriana, éste fenómeno ha sido atribuido a diversas comunidades microbianas, incluyendo también a hongos y protozoos. La gran diversidad funcional de los hongos edáficos y su capacidad para colonizar multitud de microhabitats, puede influir tanto en los niveles de patógenos como en la mejora de la salud y de la producción del cultivo. En éste sentido, Penton *et*

*al.*, (2014) observaron mayores índices de supresión de enfermedades cuando los suelos presentaban una mayor diversidad fúngica.

Una de las primeras clasificaciones de la microbiota fúngica del suelo fue realizada por Burges (1960). En ella, los géneros más abundantes fueron *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Mortiriella*, *Phytium*, *Saprolegnia*, *Monosporium* y *Chaetomium* (Tello *et al.*, 2011). Esta clasificación se basaba en la diferenciación de hongos autóctonos del suelo (aquellos que intervienen en los ciclos biogeoquímicos del suelo y cuyo hábitat es el suelo) y zimógenos (que se desarrollan cuando disponen de un sustrato alimenticio adecuado). En la identificación de hongos del suelo realizada por Garret (1956), se diferenciaban los parásitos obligados (parásitos invasores del suelo) y verdaderos organismos habitantes del suelo (zimógenos y autóctonos). En éste sentido, dado que la microbiota del suelo está condicionada por las fuentes nutritivas disponibles, los aportes de materia orgánica fomentan a los verdaderos habitantes del suelo (basados en el saprofitismo), desplazando a los invasores perjudiciales de la rizosfera (Dalal, 1998). Hay que añadir que géneros fúngicos como *Alternaria*, *Cladosporium* o *Humicola* sintetizan sustancias parecidas a las sustancias húmicas del suelo, generando así una función muy importante en el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Martinez, 2009).

Así mismo, son diversos los estudios realizados en ambientes mediterráneos. El trabajo de Martínez *et al.* (2009), concluye que los géneros más frecuentes fueron *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Penicillium*, con predominio de *Aspergillus* en un suelo no arenado durante el ciclo de cultivo de pimiento en el Campo de Cartagena. Del mismo modo, Tello y Lacasa (1990) observaron siempre mayores poblaciones fúngicas en suelos colonizados por raíces que en suelos desnudos, en los que los hongos aislados pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, y *Fusarium* spp.

Debe considerarse la imperfección de las técnicas analíticas convencionales empleadas en estudios para la evaluación de la microflora total (hongos y bacterias) contenida en distintos tipos de suelos. Así, éstas técnicas comúnmente empleadas, entre las que destaca la técnica de las diluciones sucesivas (Tello y Lacasa, 1990) en esencia

consisten en la expresión de los microorganismos en un medio de cultivo determinado, presentan un carácter fundamentalmente cualitativo. En éste sentido, proporcionan principalmente información sobre la presencia o ausencia de determinados microorganismos, que dependerán, en gran medida, del medio empleado. Además, los errores cometidos con la técnica son elevados porque en ella se puede producir una sobreestimación, por ejemplo, de hongos, debido a la fragmentación del micelio y/o dispersión de esporas, o por el contrario, puede existir una posible interacción entre microorganismos debido a la producción de antibióticos y/u otros diferentes mecanismos de antagonismo (Parkinson *et al.*, 1971; Wollum 1982). Así mismo, la divergencia en las clasificaciones realizadas se debe a la dificultad de obtener unas muestras que se puedan extrapolar a todo el suelo. Estudios realizados por Rodríguez Molina (1996) y Rodríguez Molina *et al.* (2000) han demostrado la gran variabilidad microbiana de las muestras estudiadas, así una de las principales conclusiones obtenidas se traduce en que la muestra estudiada es representada por sí misma.

Estos aspectos dificultan en gran medida realizar un estudio sobre la microbiota del suelo y establecer unos parámetros de forma general. Por ello, para la determinación de la estructura de las comunidades biológicas, la mayoría de los autores recurren a diversos índices o parámetros descriptivos que expresan de manera indirecta la diversidad biológica de la comunidad considerada.

En éste sentido, dado que los microorganismos juegan un papel decisivo en la fertilidad del suelo y puesto que la materia orgánica influye de manera directa sobre ellos, resulta interesante el conocimiento de la estructura de las comunidades microbianas presentes en distintos suelos agrícolas de las provincias de Almería y de Granada. Para ello, en el presente estudio se emplearán los índices o parámetros de diversidad más utilizados, con la intención de determinar la estructura de la comunidad fúngica de suelos agrícolas bajo invernadero, y relacionarla con el contenido de materia orgánica en los mismos.



### 1.3.- Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la relación existente entre la comunidad fúngica de suelos agrícolas bajo abrigo en monocultivo y su nivel en materia orgánica.

Para llevarlo a cabo, los objetivos específicos se dividen en dos aspectos principales:

- Evaluar la diversidad fúngica y el contenido en materia orgánica de suelos de invernadero que sostienen cultivos de pepino y de tomate en la provincia de Granada.
- Establecer una relación entre el porcentaje de materia orgánica del suelo y la diversidad fúngica que contiene.

Así mismo, dicha microbiota fúngica también ha sido evaluada en función de factores como: 1) la zona de procedencia de las muestras de suelo y 2) el tipo de cultivo que éstos sustentan. Mediante éste estudio se trata de establecer relaciones que puedan esclarecer, de alguna manera, hasta qué punto factores como el contenido en materia orgánica, la zona o el tipo de cultivo determinan la comunidad fúngica presente en los suelos agrícolas.

## 2.- Revisión bibliográfica

### 2.1.- Clasificación de la comunidad fúngica del suelo

El suelo ha sido considerado como un ente vivo por diversos autores debido a la gran cantidad de microorganismos que aloja y hacen posible que sea un sistema útil desde el punto de vista agronómico. Esta microbiota capacitará al suelo para generar vida vegetal, ya que en ausencia de esta microbiota la vida vegetal sería prácticamente nula. A rasgos generales, esta población microbiológica está conformada por bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos (Tello *et al.*, 2011). Gracias a esta microbiota el suelo puede proveer los nutrientes necesarios a los vegetales debido a su intervención en los ciclos biogeoquímicos del suelo. De modo que esta microbiota edáfica es la que confiere al suelo unos niveles de fertilidad, control de patologías vegetales de origen edáfico, etc. A su vez, la distribución de determinados géneros de microbiota edáfica nos dará información sobre la vitalidad del propio suelo, por lo tanto es de especial interés conocer estas poblaciones, identificarlas y estudiar qué función desempeña cada una, así como las asociaciones desarrolladas entre ellas.

A lo largo de siglo XX varios autores han abordado la tarea de establecer una clasificación de la comunidad microbiana del suelo. Entre ellas encontramos la clasificación de Pochón y de Barjac (1958), Burges (1960), Dommergues y Mangenot (1970), Garret (1970), Lockwood (1977, 1988).

A su vez, existe una gran cantidad de literatura especializada en la clasificación de la estructura fúngica del suelo. Esto se debe a la complejidad de obtener unos resultados adecuados, extrapolables al resto del suelo analizado, así como la variación en los géneros fúngicos identificados debido a numerosos factores. Como se desarrollará más adelante, las técnicas analíticas utilizadas para obtener estos resultados presentan diversas limitaciones y ello complica y dificulta la obtención de una clasificación microbiana edáfica de carácter general.

Una de las primeras clasificaciones realizadas fue la que llevó a cabo Gilman en 1954 (Burges, 1960). En ella aparecían los géneros fúngicos con mayor unidad de colonia formadora que se aislaron del suelo. Entre ellos se encontraban *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Achlya*, *Mortierella*, *Phytium*, *Saprolegnia*, *Monosporium* y

*Chaetomiun*. Esta clasificación aloja limitaciones y carece de unos parámetros diferenciadores que agrupen los géneros en diversos grupos. De la misma forma hay que tener en cuenta que la mayoría de los géneros descritos en esta clasificación presentan una función saprofítica, por lo que no existen diferencias en base a otro tipo de funciones metabólicas.

Otra clasificación realizada en la misma línea fue la que Burges atribuyó a Winogradsky y de la que no se dispone una fecha clara (Martinez *et al.*, 2009). En esta clasificación se establecían dos grupos de organismos edáficos:

1.- En primer lugar se encuentran los organismos autóctonos del suelo. Estos organismos se clasifican como los verdaderos colonizadores del suelo, aquellos que intervienen de forma imprescindible en los ciclos biogeoquímicos de los suelos, presentes en suelos no cultivados, donde ningún tipo de materia orgánica específica relativa a un huésped vegetal fomenta el desarrollo de estos organismos, únicamente tienen cabida los verdaderos habitantes del suelo. Estos organismos en principio no presentan preferencias en el tipo de materia orgánica que haya en el suelo, ya que, teóricamente, se encuentran presentes en todos los suelos.

2.- En segundo lugar alberga a los organismos zimógenos. Este grupo presenta un menor protagonismo en la estructura edáfica. Únicamente adquieren actividad en presencia de un sustrato determinado. Por lo tanto para este grupo de organismos resulta imprescindible el tipo de cultivo que esté presente en la rizosfera para medrar.

Esta clasificación generó controversia entre los científicos especializados, deduciendo que ante la definición del grupo de organismos autóctonos del suelo ningún hongo podría considerarse verdaderamente autóctono del suelo ya que se mantenía que la materia orgánica procedente de un determinado huésped vegetal, tanto de origen agrícola como no cultivado, presentaba un factor importante que limitaba la estructura fúngica edáfica. De esta forma fomentaría el desarrollo de unos géneros en detrimento de otros. Finalmente se estableció que los verdaderos habitantes del suelo (Burges, 1960) eran aquellos que habitaban de forma natural aquel medio sin estar asociados a ningún tipo de huésped, ya fuese, animal o vegetal.

El ejemplo que propuso Burges (1960) para demostrar la existencia de organismos autóctonos del suelo fue la identificación del género *Zygorrhynchus* en capas profundas de suelos arenosos donde su micelio se extendía por las partículas arenosas sin estar, aparentemente, unido a ningún sustrato orgánico específico, ya que su alimentación se basaba en pequeñas cantidades de azúcares simples y de aminoácidos presentes en el suelo. De esta forma también se demostró que el género *Mortierella* se comportaba de la misma forma.

Autores como Waksman (1944) también elaboraron clasificaciones sobre la comunidad fúngica del suelo diferenciando dos tipos de organismos:

- I. Habitantes del suelo: los cuales presentaban una autonomía alimentaria en el suelo y adquirirían una distribución geográfica bastante amplia.
- II. Invasores del suelo: estos organismos poseen una limitación alimentaria por lo que su actividad será limitada, así como una distribución geográfica más localizada.

Teniendo en cuenta estas clasificaciones se puede concluir que cualquier organismo fúngico del suelo puede estar asociado a ambos grupos. Por lo tanto se dispuso a establecer un parámetro que diferenciase a cada organismo fúngico del suelo en un grupo y de esta forma intentar establecer un consenso científico. El primer concepto en el que pensaron los autores fue que para que un organismo fuese un habitante autóctono del suelo debía completar su ciclo biológico en él (Waksman, 1944). Por lo tanto, era imprescindible encontrar micelios vegetativos que corroborasen que los hongos eran habitantes autóctonos del suelo. Además de identificar los micelios en el suelo se demostró que los hongos establecían una función imprescindible en la formación de agregados en el suelo (Martinez *et al.*, 2009).

A su vez, Garret (1956) elaboró otra clasificación de la comunidad fúngica que habitaba el suelo debido a su desacuerdo con los demás autores que realizaron clasificaciones. Esta clasificación ha tenido una mayor aceptación por parte de la comunidad científica especializada en microbiología. En ella se tienen en cuenta un mayor número de parámetros diferenciales entre los microorganismos, dando la posibilidad de ampliar el número de grupos que forman esta clasificación respecto a las demás realizadas.

En la clasificación se diferencian los siguientes grupos:

- I. 1.- Parásitos obligados
- II. 2.- Parásitos habitantes o invasores del suelo, e invasores de tejidos en destrucción
- III. 3.- Verdaderos organismos del suelo
  - ❖ Zimógenos
  - ❖ Autóctonos

Los parámetros más destacados que dieron un mayor rigor a esta clasificación fueron, fundamentalmente, la separación y/o diferenciación de los organismos invasores del suelo de los habitantes del suelo. Esta separación demuestra de nuevo que el parasitismo y las fuentes nutritivas del sustrato son las que definen el grupo de cada uno de los organismos fúngicos identificados. De forma que los habitantes del suelo (verdaderos habitantes) son aquellos basados en la actividad saprofítica y el parasitismo. En cambio los invasores del suelo son aquellos que medran en presencia de un hospedante determinado y que ante su ausencia durante un espacio de tiempo pueden cambiar su metabolismo hacia saprófitos, pero si la ausencia se prolonga en el tiempo quedarán desplazados por los organismos saprofíticos (verdaderos habitantes) que compiten por la materia orgánica. Por lo tanto, los verdaderos habitantes del suelo serían aquellos que se mantienen en el tiempo a través de un metabolismo saprofítico en el suelo mediante una competición por los alimentos y no precisen de un hospedador específico para su supervivencia.

A pesar de esta rigurosa clasificación, en la que se incorporan nuevos conceptos clasificadores con un mayor grado de especialización para la comunidad fúngica, existen autores que siguen sin conformar un consenso general referente a la clasificación de Garret (1956) debido a que no todos los géneros fúngicos se comportan tal y como establece la clasificación. Dentro de estos autores encontramos a Cooke y Whipps (1980); Raper (1968) in Lockwood (1988), así como, Tello y Lacasa (1990) donde demuestran como *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (parásito especializado) es capaz, en ausencia del hospedador, de germinar en turba de uso hortícola y de

esporular produciendo microconidias en un sustrato orgánico de uso hortícola enriquecido.

Por lo tanto, a través de esta demostración de Tello y Lacasa (1990), hace que la clasificación de Garret (1956) pierda fundamento en la comunidad científica, ya que un hongo especializado (zimógeno) es capaz de medrar en ausencia de su huésped, algo contradictorio para lo anteriormente expuesto referente a la clasificación de la comunidad fúngica del suelo.

### **2.1.1.-Saprotitismo de la comunidad fúngica del suelo**

Tras el conjunto de clasificaciones expuestas por los diversos autores sigue sin formarse una clasificación que pueda ser del todo exacta ya que surgen contradicciones con determinados géneros fúngicos, los cuales podrían pertenecer a varios grupos de las clasificaciones existentes. Es necesario esclarecer los parámetros clasificatorios de la comunidad edáfica.

Los estudios de Garret (1970) abren un nuevo escenario en la clasificación de la comunidad fúngica del suelo. Garret se basa en estudiar la capacidad saprofítica de los hongos fitopatógenos considerados, por las anteriores clasificaciones, como invasores del suelo (zimógenos). De esta forma aporta información importante acerca del comportamiento de estos organismos fitopatógenos en el suelo cuando se encuentran en fase de saprotitismo. Esta capacidad saprofítica de los hongos fitopatógenos es considerada, de forma general, como una estrategia de supervivencia (Martínez *et al.*, 2009). Esta supervivencia la llevan a cabo mediante la colonización de los sustratos orgánicos muertos, normalmente procedentes de plantas muertas. Otra forma de supervivencia se basa en el saprotitismo sobre tejidos de la planta hospedante la cual fue parasitada previamente por él mismo. Por último, también pueden recurrir a formas quiescentes localizadas en los tejidos vegetales del huésped parasitado.

En este tipo de estudios acerca de la capacidad saprofítica de los organismos fitopatógenos se utilizaron diferentes tipos de fuentes nutritivas orgánicas para determinar que organismos eran los que se desarrollaban con mayor rapidez en ellos y así clasificarlos en función de sus preferencias para determinados sustratos.

De esta forma demostraron que *Rhizoctonia solani* era capaz de sobrevivir, mediante esta fase saprófita de competencia, en suelos agrícolas debido a su facilidad para descomponer la celulosa. Del mismo modo se utilizaron sustratos como semillas de cáñamo hervidas para *Pythium*, pelo humano para determinar los descomponedores de queratina, así como que *Fusarium culmorum* era el primer colonizador en las pajas de trigo (Martínez *et al.*, 2009).

Mediante estos estudios se ha podido demostrar la existencia de una fase saprofítica en los hongos fitopatógenos del suelo, así como una diferenciación entre diferentes géneros, inclusive especies, en su habilidad para colonizar sustratos, independientemente de su capacidad de permanencia en ellos a través de mecanismos de quiescencia.

De esta forma surgen nuevos aspectos a tener en cuenta en la clasificación de la comunidad fúngica del suelo, la capacidad saprófita. De nuevo Garret (1970) desglosa una serie de parámetros que definirán la capacidad competitiva saprofítica de los organismos edáficos:

- I. Capacidad propia de la especie y/o la cepa.
- II. Potencial de inóculo del organismo en el sustrato
- III. Potencial de inóculo de los competidores en el sustrato

### **2.1.2.- Colonización competitiva saprofítica de los sustratos**

Esta capacidad saprofítica de supervivencia que realizan los hongos fitopatógenos, los cuales quedaron definidos como organismos asociados a una determinada fuente nutritiva (Garret, 1956), no se encuentra desligada de las fuentes nutritivas en la nueva clasificación llevada a cabo por Garret (1970). A su vez Tello *et al.*, (2011) consideran que el saprofitismo no puede quedar separado de las fuentes nutritivas y que por lo tanto se traduce en una competición de los hongos por las fuentes nutritivas. Por lo tanto es preciso realizar una aclaración acerca de lo que se considera como fuente nutritiva o sustrato

Martínez *et al.*, (2009) llevaron a cabo una clasificación acerca de lo que se considera como fuentes nutritivas para los hongos edáficos, de esta manera se encontraron diferencias en función del grado de especificación acerca del concepto sustrato:

- I. Sustrato en sentido amplio: material, fundamentalmente tejido de plantas que un hongo coloniza y sobrevive a base de él.
- II. Sustrato de forma restrictiva: considerado como un constituyente particular del tejido de la planta o de la materia orgánica fresca que es descompuesta por un hongo en particular (azúcar, pectinas, hemicelulosa, celulosa y/o lignina).

Esta clasificación esclarecedora de lo que ha de considerarse como sustrato o fuente nutritiva y que es colonizado por la comunidad fúngica del suelo tiene sus orígenes de unas afirmaciones llevadas a cabo por Garret (1970). En ellas surge el concepto de habilidad saprofítica de competición. Esto consiste en la habilidad de determinados hongos edáficos para colonizar ciertos sustratos en función de su composición, tal y como queda explicado en la definición de sustrato de forma restrictiva.

Según Garret (1970), existen dos grupos fúngicos en función de su fuente nutritiva:

En primer lugar encontramos a aquellos hongos que utilizan los azúcares de los sustratos como fuente de alimento, así como otros compuestos carbonatados del tejido vegetal estructuralmente más simples que los azúcares. En ella podemos encontrar el género *Pythium*. Estos hongos presentan un comportamiento de crecimiento rápido, colonizando los sustratos de forma anticipada a los demás géneros fúngicos del suelo.

El otro grupo está formado por aquellos hongos descomponedores de celulosa y lignina. Aquí podemos encontrar especies como *Chaetomium thermophile*. Este hongo, a través de su metabolismo, permite la aparición de un nuevo género, *Humicola*, en el mismo sustrato. Esto se debe a que el género *Humicola* se alimenta de los productos que se generan de la descomposición de la celulosa (Tello *et al.*, 2011). Por lo tanto, se puede afirmar que existe un comensalismo en la comunidad fúngica del suelo a la hora de colonizar sustratos en el suelo.



Esta habilidad saprofitica de competición de los hongos edáficos para colonizar sustratos queda totalmente definida por la composición de estos últimos y por lo tanto existirán tantas habilidades saprofiticas de competición como tipos de sustratos haya.

Tras incorporar esta idea asociativa de la capacidad saprofitica de competición y la composición del sustrato, se definen una serie de comportamientos de los hongos en función de su capacidad de colonización de sustratos (Martínez *et al.*, 2009):

- I. Germinación rápida de los propágulos fúngicos y rápido crecimiento de las hifas jóvenes cuando son estimuladas por nutrientes solubles que se difunden desde el sustrato a colonizar.
- II. Conjunto de enzimas para la descomposición de los constituyentes carbonados más resistentes de los tejidos de la planta, tales como celulosa o lignina.
- III. Secreción de productos bacteriostáticos y/o fungistáticos, incluyendo antibióticos.
- IV. Tolerancia a sustancias fungistáticas producidas por otros microorganismos del suelo.

Garret (1970) también elaboró una clasificación en función de la capacidad saprofitica de competición de los hongos, la cual queda definida en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Caracterización de los hongos por su capacidad saprofitaria para competir por los sustratos (Garret, 1970).

	Germinación y crecimiento rápidos	Enzimas para la degradación de celulosa y/o lignina	Producción de antibióticos y sustancias fungistáticas	Tolerancia a antibióticos y sustancias fungistáticas
Hongos saprofiticos primarios del azúcar. Colonizadores pioneros de sustrato fresco de plantas	+	-	-	-
Hongos saprofiticos secundarios del azúcar. Asociados con descomponedores de celulosa y lignina	-	-	+	+
Hongos de la superficie de la raíz y de la rizosfera	-	-	+	+
Descomponedores de celulosa y lignina	-	+	+	+

**Fuente:** Martínez *et al.* 2009.

Tras analizar la capacidad saprofítica de colonización de la comunidad fúngica del suelo es necesario establecer una especificación acerca de los parámetros que la determinan. De la misma forma que se estableció el concepto de potencial de inóculo para los organismos fitopatógenos a la hora de colonizar tejidos surgió el mismo concepto pero relacionado con la capacidad saprofítica de competición.

Fue, de nuevo, Garret (1970) quien elaboró este concepto, definido como la energía de crecimiento de un hongo disponible para la invasión de un sustrato. Pero, ¿Qué factores y/o aspectos son los que determinan el éxito de determinados géneros en la colonización de los sustratos?

Martínez *et al.*, (2009) elaboran una lista con una serie de factores tales como, el nivel de población del propio hongo en el suelo, el vigor de los propágulos, así como las reservas nutritivas del sustrato y las condiciones climáticas.

Es necesario diferenciar la colonización saprofítica de los sustratos de la colonización de los tejidos vegetales por fitopatógenos, ya que ambos presentan un origen común desde el punto de vista de la colonización fúngica de materiales orgánicos pero que para el caso de los sustratos se consideran como inertes, debido a que no presentan ningún tipo de mecanismo de resistencia a la colonización fúngica, tal y como lo presenta la rizosfera para los organismos fitopatógenos. Por lo tanto, ante la ausencia de estos mecanismos de defensa en los sustratos, la población de propágulos de un determinado género fúngico tendrá un mayor peso ante la colonización competitiva, que la infección del hospedante. Pero esto no significa que una mayor población de propágulos en el suelo, correspondiente a un determinado género, lo colonice exitosamente, ya que el éxito de la colonización depende de más factores. De esta forma se puede afirmar que ante una mayor población de propágulos se podría, por ejemplo, compensar la ausencia de vigor de los propágulos así como su baja capacidad de competición saprofítica.

Por lo tanto, tras estas afirmaciones se puede concluir que la colonización de una porción de sustrato por un determinado hongo está determinada por su habilidad de

competición saprofítica intrínseca, así como el equilibrio entre su potencial de inóculo y el de las especies competidoras (Martínez *et al.*, 2009).

Diversos estudios han demostrado lo anteriormente expuesto a través de trabajos experimentales utilizando hongos como *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* (*F. culmorum*), *Cochliobolus sativus*, *Curvularia ramosa* y *Ophiobolus graminis*.

Considerando, a través de estudios previos, a *F. culmorum* como un gran competidor saprofítico, a *O. graminis* como un competidor más débil, *Curvularia ramosa* como no sintetizadora de sustancias antifúngicas y a *C. sativus* sintetizadora de antifúngicos, se demostró, utilizando como sustrato pajas de trigo, que *F. culmorum* y *Curvularia ramosa* presentaban un saprofitismo más vigoroso que *O. graminis* y *C. sativus*. Esta débil capacidad saprofitaria se atribuye a que ambos presentan una mayor susceptibilidad a las sustancias fungistáticas emitidas por los microorganismos del suelo así como a su baja capacidad para penetrar en el tejido de los sustratos.

Otra ensayo relacionado con el estudio del potencial de inóculo de los hongos edáficos fue el que se llevo a cabo mediante la evaluación de la energía de crecimiento de *F. culmorum*. Dicho hongo fue cultivado en diferentes medios cuya variación era el nivel de nutrientes. El primero presentaba 20 g/L de glucosa y el otro 1 g/L. Los resultados concluyeron que en el medio de 20 g/L de glucosa, las conidias formadas presentaban un carácter más infectivo. Sin embargo, la germinación fue mayor en el medio más pobre, en el cual germinaron el 87%, ya que en el medio más rico fue del 78%.

De esta forma es concluyente que el efecto de los nutrientes exógenos que alimentan al inóculo queda totalmente inherente al potencial de inóculo.

## **2.2.- Principales géneros fúngicos de los suelos del sureste español**

La micoflora característica de los suelos de una zona sigue siendo, en la actualidad, un tema complicado de determinar, principalmente debido a las deficiencias en las técnicas analíticas utilizadas para su identificación.

A lo largo de la historia se han examinado una amplia variedad de suelos con diferentes tipos de vegetación y en gran cantidad de áreas geográficas diferentes para intentar determinar qué tipo de micoflora se desarrolla en ella y de esta forma

caracterizar los suelos en base a su comunidad fúngica. Sin embargo, autores como Waksman (1916, 1917) determinaron que existían una serie de hongos que podían encontrarse en cualquier zona geográfica, por muy lejos que se encontraran. Según él, estos hongos correspondían con los géneros *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp, así como, *Zygorrhynchus* sp, *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *Rhizopus* sp, *Fusarium* sp, *Verticillium* sp. Pero esta hipótesis fue puesta en entredicho por Burgues afirmando que esta uniformidad en la comunidad fúngica de los suelos podría estar asociada a que en todos los análisis se había utilizado el mismo método analítico, por lo que, presuntamente, se estaría enmascarando a una gran cantidad de hongos que de forma simultánea, habitaban también esos suelos. Esta uniformidad se achacaba también a que los géneros citados por Waksman presentaban esporas con estructuras fácilmente características e identificables.

A su vez, diversos estudios han analizado diferentes suelos, tanto agrícolas, bajo diferentes tipos de cultivo, como forestales, para poder determinar qué tipo de micoflora poseen. La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo en base a los principales patógenos que afectan a los cultivos característicos de las zonas muestreadas, por lo que no existe una lista completa en base a la micoflora del suelo característica del sureste español.

El llevado a cabo por Martínez *et al.*, (2009), donde se analizaron explotaciones agrícolas bajo invernadero con cultivo de pimiento en la zona de Cartagena (Murcia). De forma generalizada, fueron identificados los géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. y *Trichoderma* spp. Este último se detectaba casi exclusivamente en aquellos invernaderos en los que se aplicó como método de control biológico. Esporádicamente, fueron otros los géneros aislados como *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Mortierella* spp. o *Chaetomium* spp. pero dada su baja frecuencia no se han tenido en cuenta a la hora de expresar los resultados.

Uno de estos estudios abordó la identificación de la micoflora telúrica de explotaciones situadas en diferentes zonas del sureste español, así como bajo diferentes tipos de cultivo (Tello y La Casa, 1990). En primer lugar se muestreó la zona de Cartagena (Murcia) bajo cultivo de clavel y afectado por *F. oxysporum*. En ellas se identificaron

*Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Stemphyllium* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum*, entre los cuales, *Alternaria*, *Penicillium* y *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum*) fueron los más comunes y más abundantes. Posteriormente se analizaron otras explotaciones situadas en Águilas (Murcia) donde, anteriormente, se había cultivado tomate con frecuencias de 3 a 5 años, ahora había cultivo de clavel, también contaminado por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. En ellas se identificaron los géneros de *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botryotrychum* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum*), *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp y *Stemphyllium* sp.

La siguiente zona analizada en este trabajo fue la del Campo de Dalías (Almería) donde se determinó la micoflora presente en el estiércol utilizado para las enmiendas orgánicas. En ellas se encontró *Apergillus*, *Botryotrychum*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stemphyllium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *F. oxysporum*, *F solani* y *F. roseum*.

Otro análisis determinó la micoflora presente en invernaderos con cultivo de tomate (cv. Carmelo) en la zona de Mazarron (Murcia), los cuales habían sido previamente desinfectados con metam-sodio. En general, la micoflora total identificada no difiere de la hallada en el Campo de Cartagena y en Águilas: *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. roseum*, *F. solani*), *Humicola* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Staphylotrichum* sp., *Stemphyllium* sp.

Por último, se llevó a cabo un análisis, en Sierra de Espuña (1250 m altitud), de la rizosfera de plantas de tomillo y romero, así como de plántulas de encina, jara y retama. En ellas se identificaron los géneros *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum*), *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Stemphyllium* sp. y *Trichoderma* sp.

De esta forma se llegó a la conclusión de que una gran parte de la microflora total identificada se encuentra ampliamente repartida en los suelos, partes aéreas y subterráneas de las plantas, en los restos vegetales y materia orgánica. Y su presencia es común en diferentes zonas geográficas y bajo distintos cultivos, pudiendo variar su

densidad de población en función del porcentaje en materia orgánica presente, ya que forma parte de su sustento de vida.

Otro estudio, basado en la determinación de la comunidad fúngica en cultivos de uvas, tanto variedades blancas como rojas, en las zonas de Valencia (Bobal y Moscatel), Albacete (Bobal, Garnacha, Tempranillo), Murcia (Monastrell), Alicante (Monastrell) y Málaga (Moscatel) dio lugar a la identificación de los géneros *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., y *Phoma* sp. (Medina *et al.*, 2005). A pesar de no diferenciar la microbiota identificada por zonas y variedades se pudo observar como había diferencias en su composición, donde Tempranillo fue la variedad más colonizada, siendo *Phoma* sp. el género que se aisló con más frecuencia. En cambio, Moscatell fue la variedad de la que menos hongos se identificaron. Se podría concluir que los géneros identificados en estos análisis pueden identificarse en cualquier zona geográfica, ya que las zonas muestreadas difieren en altitud y latitud, pero comparando estos análisis con otros similares vemos como Abrunhosa *et al.*, (2002) no identificó *Aspergillus* sp. en muestras de uvas en Portugal. En cambio, Battilani *et al.*, (2003) sí que lo identificó en muestras de suelo bajo vid en Italia. A su vez, se concluye que Magnoli *et al.*, (2003) identificaron una clara dominancia en el género *Alternaria* sp. en suelos bajo vid cultivadas en Argentina, coincidiendo así con los de Medina *et al.*, (2005) pero defiriendo en los niveles de *Cladosporium* sp. donde los españoles presentaban niveles más bajos.

A simple vista vemos como existen diferencias en la comunidad fúngica de las diferentes variedades de uva, con mayor o menor dominancia en determinados géneros fúngicos pero esto no puede ser concluyente desde el punto de vista de que ciertas variedades de vid den lugar a una micoflora, ya que deben tenerse en cuenta más factores determinantes en la micoflora del suelo, como el porcentaje en materia orgánica, así como, el tipo de cultivo que ha habido en esas explotaciones, ect.

De la misma forma, se observa una determinada uniformidad en la presencia de géneros identificados en diferentes países como España, Italia o Argentina, por lo tanto es complicado establecer comunidades fúngicas características de determinadas zonas, debido, principalmente, a las técnicas analíticas, las cuales no permiten llevar a

cabo un análisis totalmente completo de la comunidad fúngica del suelo y contrastarlo con otras zonas.

### **2.3.- Técnicas analíticas para la evaluación de la comunidad fúngica del suelo**

Desde mediados del siglo XX comienza a realizarse un profundo análisis de la microbiota edáfica, muestreando, identificando los diferentes géneros que aparecen en las muestras, clasificándolos en base a sus funciones en el suelo, etc. Pero a día de hoy no existen técnicas que den irrefutabilidad absoluta a las muestras dado la elevada complejidad que conlleva el estudio de la microbiota edáfica.

Las consecuencias de este problema son diversas, pero son totalmente achacables a las deficiencias existentes en las técnicas analíticas usadas para el estudio de la comunidad microbiana edáfica, entre las cuales, una de las más comunes lleva usándose más de medio siglo. A su vez, gran cantidad de bibliografía referente a las técnicas analíticas ponen en evidencia la imposibilidad, por ejemplo, de establecer una diferenciación completa acerca de los habitantes de la rizosfera de los de la rizoplanea, así como de los del suelo desnudo.

Diversos autores han intentado establecer mejoras en las técnicas existentes, tal es el caso de Bouhot, analizando el poder infeccioso de suelos contaminados con *Pythium*. De la misma forma, De Cara *et al.*, (2006; 2007) comienza a poner a punto técnicas de fitopatometría de suelos, pero presentan nuevos inconvenientes que limitan un análisis completo, debido a que estas técnicas no cuantifican por separado diferentes fracciones microbianas del suelo. Estudian las fracciones microbianas y su relación con las plantas que se utilizan a modo de trampas. Muchas observaciones serán necesarias para evaluar la representatividad de estas técnicas.

Rodríguez Molina (1996) ha intentado identificar cuáles podrían ser las deficiencias de estas técnicas analíticas. En este punto, la autora trata de establecer mejoras en las técnicas usadas para la identificación del género *Fusarium* en aspectos tales como; la variabilidad de los resultados dependiendo de la dilución de la muestra (**Tabla 2**), la variabilidad de los resultados en función del tiempo de almacenamiento de la muestra, que precisión es necesaria, que grado de repetibilidad es necesario para cada una de las muestras y reproducibilidad del método analítico.

En dicho trabajo se evaluaron las muestras procedentes de una calicata de 1m x 1m x 0.8m. En las caras se marcaron cuatro horizontes de 10 cm de profundidad cada uno. En una de las caras se marcaron, adicionalmente, cuatro horizontes más hasta alcanzar una profundidad de 80 cm. En la línea media de cada horizonte se marcaron 10 puntos equidistantes entre sí 10 cm. De cada punto se tomó una muestra de tierra de 35-45 g con la humedad que tenía en ese momento. Como consecuencia de la elevada densidad de población de la muestra, se procedió a su dilución en talco.

A pesar de esta minuciosa recogida de muestras los resultados fueron bastante singulares.

**Tabla 2.** Efecto de la dilución en talco sobre el número de colonias (U.F.C) de *Fusarium* (Rodríguez Molina, 1996).

Dilución	U.F.C. g <sup>-1</sup> suelo			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. roseum</i>	<i>Fusarium</i> total
1:0	8.872 ± 4.959 c	301 ± 200 d	1928 ± 1.002 c	11.101 ± 4.251 c
1:5	16.353 ± 10.981 ab	717 ± 292 b	2.237 ± 1.538 c	19.313 ± 11.702 b
1:10	16.694 ± 11.869 a	544 ± 442 c	4.531 ± 3.673 a	21.771 ± 14.342 a
1:15	15.776 ± 12.557 b	1.081 ± 736 a	3.486 ± 4.310 b	20.349 ± 16.381 b

Los valores (media ± desviación típica) en cada columna seguidas de la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Análisis de la varianza seguido del Test de Student-Newman-Keuls para los grupos homogéneos.

Fuente: Martínez *et al.* 2009.

Concluyéndose que la dilución en talco de las muestras de *Fusarium* da lugar a poblaciones más elevadas que en las no diluidas, complicando así una estimación razonable.

A su vez Rodríguez Molina (1996), realizó otro estudio mediante el uso de 18 muestras de suelos de cultivos con cerezo, espárrago, tabaco, hortalizas, así como de pinar y dehesa para identificar la microbiota fusárica después de 0, 6, 12 y 18 meses de haber recogido las muestras y depositarlas en el laboratorio. Los resultados fueron concluyentes de tal forma que la densidad de la población fusárica disminuye con el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente (**Tabla 3**).



**Tabla 3.** Efecto del tiempo de almacenamiento en el número de U.F.C. /g de suelo en *Fusarium* (Rodríguez Molina, 1996).

Tiempo de almacenamiento (meses)	U.F.C. g <sup>-1</sup> suelo
0	9.979 ± 8.333 a
6	4.705 ± 4.194 b
9	983 ± 1.142 c

Los valores (media ± desviación típica) en cada columna seguidas de la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Test de Student-Newman-Keuls para los grupos homogéneos.

Recalculado de  $x * F = 2.965,46 * gL1 = 2 * gL2 = 162$ .

Fuente: Martínez *et al.* 2009.

De la misma forma que Rodríguez Molina (1996) analizó los aspectos anteriores sobre técnicas analíticas, también realizó su estudio basado en que precisión, repetibilidad y reproducibilidad era precisa para obtener un método analítico fiable para los hongos del género *Fusarium* en el suelo. La repetibilidad fue estimada a través del análisis de las diferencias entre los resultados de análisis sucesivos de la misma muestra y en las mismas condiciones: la misma técnica de análisis, el mismo analista, el mismo laboratorio, los mismos aparatos, y un corto intervalo de tiempo (8-10 días) entre los análisis sucesivos de la misma muestra. Para evaluar la reproducibilidad estimó las diferencias entre los resultados de análisis realizados sobre las mismas muestras y empleando la misma técnica de análisis, pero en condiciones diferentes obteniendo los resultados expuestos en la **Tabla 4**:

**Tabla 4.** Efecto de la tanda de análisis, sobre el número estimado de U.F.C. /g de suelo en *Fusarium* (Rodríguez Molina, 1996).

Grupo de muestras	Número de muestras	U.F.C. g <sup>-1</sup> suelo	
		Análisis 1	Análisis 2
1	6	10.263 ± 3.059	15.213 ± 5.020
2	6	7.657 ± 2.534	6.020 ± 2.336
3	6	5.373 ± 1.200	8.245 ± 1.699

Los valores (media ± desviación típica) de los tres grupos de muestras difieren según la tanda de análisis. Test de Wilcoxon para muestras apareadas,  $T = 2,20$  en los tres grupos;  $p < 0,05$ .

Fuente: Martínez *et al.* 2009.

Por lo tanto, tras este análisis llevado a cabo por Rodríguez Molina (1996), cabe resaltar la inmensa complejidad que presentan las técnicas analíticas utilizadas, las

divergencias poblacionales que podemos encontrar tras la modificación de alguna de sus condiciones, por pequeña que sea.

A la hora de abordar este tema sobre las técnicas analíticas es necesario tener en mente de que estamos estudiando un cosmos microscópico totalmente opaco para nuestra vista y que precisa de una enorme complejidad analítica.

Han sido dos las técnicas generalmente utilizadas para el análisis de la microbiota edáfica. En primer lugar, consiste en su identificación mediante el microscopio directamente sobre el suelo. En segundo lugar está la técnica de aislamiento, ya sea mediante técnicas de cultivo o bien directamente (Martínez *et al.*, 2009).

Autores tales como Tribe (1957), Parkinson (1957), Cherters y Parkinson (1959) realizaron ensayos para aislar hongos de la rizosfera en forma de micelios en crecimiento activo utilizando diferentes métodos. A su vez es preciso remarcar que los hongos en el suelo pueden encontrarse como micelios, fructificaciones o como una variedad de esporas inactivas. Garret (1955); Harley y Waid (1955) mantienen que las necesidades básicas para llevar a cabo un estudio ecológico de los organismos del suelo es establecer una diferenciación entre los organismos que son activos vegetativamente, jugando un papel importante en los procesos biogeoquímicos del suelo y aquellos otros que se encuentran en quiescencia, en forma de esporas u otros propágulos. Algo que, según Warcup (1960), muchos de los métodos utilizados no lo contemplan.

### **2.3.1.- Técnicas analíticas dependientes del medio de cultivo**

A lo largo de la historia de la identificación de la comunidad microbiana del suelo se han utilizado estas técnicas analíticas dependientes de un sustrato. Se han utilizado gran cantidad de medios de cultivo, todos ellos diseñados para identificar el mayor número de especies microbianas, en diferentes tipos de técnicas para revelar la diversidad de microorganismos asociados a parámetros de calidad del suelo como la supresión de enfermedades y la descomposición de la materia orgánica (Tunlid *et al.*, 1989; Boehm *et al.*, 1993, 1997; de Leij *et al.*, 1993; Workneh *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 1995; Hu y Van Bruggen, 1997; Maloney *et al.*, 1997). A su vez, recientemente se han diseñado nuevos medios de cultivo que maximicen la identificación de diversos

grupos de microorganismos edáficos (Balestra y Misaghi, 1997; Mitsui *et al.*, 1997). A pesar de los avances realizados se estima que menos del 0.1 % de los microorganismos encontrados en suelos agrícolas son cultivables en medios preparados (Torsvik *et al.*, 1990; Atlas y Bartha, 1998).

Por otro lado, uno de los métodos dependientes del medio de cultivo más usados en el estudio de la comunidad microbiana del suelo ha sido el nivel de comunidad de perfiles fisiológicos (CLPP), por sus siglas en inglés (Garland y Mills, 1991). Esta técnica adquiere las ventajas de los métodos tradicionales de taxonomía de bacterias, en el cual, las bacterias son identificadas mediante la utilización de diferentes fuentes de carbono. El sistema se basa en la utilización de 95 fuentes de carbono diferentes (Garland y Mills, 1991). Utilizando cada sustrato, se identifica por la reducción del colorante tetrazolio, cuyo resultado se traduce en un cambio de color cuantificado a través de un espectrofotómetro. Mediante el uso de esta técnica es necesario tener en cuenta un número importante de consideraciones. En primer lugar, la densidad inicial del inóculo debe ser estandarizada, ya que puede afectar a la valoración del color. En segundo lugar, debe tenerse en cuenta que el análisis de la diversidad funcional se basa en la presunción de que el color establecido en cada celdilla es, únicamente, una función de la proporción de organismos presentes en la muestra la cual está disponible para utilizarla en un sustrato determinado (Garland, 1997). Por último, debe tenerse en cuenta que los sustratos disponibles en el mercado no son ecológicamente relevantes, por lo que, lo más probable es que no reflejen la diversidad de sustratos que se encuentran en el medio ambiente (Konopka *et al.*, 1998).

#### **2.3.1.1.- Técnica de las diluciones sucesivas en agua estéril**

Esta técnica corresponde con una de las más utilizadas para la identificación de la microbiota fúngica. Ha sido utilizada por grandes autores como Waksman (1927), Garret (1951) o Warcup (1960). Su procedimiento se basa en preparar una suspensión de la tierra en agua y de ella se irán tomando volúmenes decimales sucesivos. Posteriormente se incorporarán al medio de cultivo preparado en placas petri.

Pese a su amplio uso por diversos autores presenta una serie de limitaciones:

En primer lugar, este método precisa de un medio de cultivo que se mezclará con las diluciones realizadas. Este medio de cultivo resulta selectivo para una serie de géneros fúngicos, pero no para todos. Por lo tanto, esto nos obliga a considerar que a través de esta técnica aislaremos solo a una parte de la microbiota fúngica presente en esa muestra, únicamente la que favorezca (seleccione) el medio usado. Suponiendo que existieran medios de cultivo selectivos o favorecedores para cada grupo de hongos debería hacerse para la misma muestra tantos análisis como medios de cultivo haya, algo totalmente dificultoso, precisamente, por la posibilidad de encontrar tantos medios selectivos como grupos de hongos existentes.

A su vez, este método no permite identificar cual fue la unidad fisiológica o morfológica que originó la colonia en la placa petri. Estudios llevados a cabo por Tello *et al.*, (1990; 1991) demuestran que la mayoría de los micelios identificados en laboratorio tienen su origen de esporas y no de fragmentos de hifas.

**Tabla 5:** Origen de las colonias fúngicas que se desarrollaron en el análisis de 10 muestras de un suelo con trigo.

Número de muestras	Nº de colonias y origen desarrollo en el medio	
	Esporas	Hifas
33	78	1
34	77	2
35	80	3
36	70	4
37	82	2
38	70	0
38a	54	0
39	62	0
39a	56	0
40	70	0

**Fuente:** (Borges, 1960); Martínez *et al.* (2009).

La **Tabla 5** resulta concluyente en el aspecto de que los hongos del suelo que no producen esporas en los laboratorios tampoco pueden ser aislados en los análisis

utilizando este método. Esta técnica presentaría su utilidad en géneros que producen esporas de forma abundante, tales como *Penicillium* o *Aspergillus* (Martínez *et al.*, 2009).

Otra limitación ampliamente criticada por diversos autores ha sido su incapacidad para aislar basidiomicetos, el segundo grupo más importante de los hongos superiores y que se encuentra abundantemente en los suelos, sobre todo en los no cultivados.

Estas limitaciones presentan dificultades a la hora de separar a los hongos verdaderamente habitantes del suelo de los considerados como invasores. Pero a pesar de estas dificultades sigue siendo una de las mejores técnicas a la hora de observar cambios en la comunidad fúngica del suelo, al llevar a cabo distintos tratamientos, comportamientos de una sola especie, etc (Burges, 1960).

A su vez, Griffiths y Siddiqui (1961) consideraban que con este método, aún con sus limitaciones, es posible detectar cambios en el número de esporas, considerando estos cambios como un barómetro de la actividad de los hongos. Pero es preciso no olvidar que el cambio en el número de esporas puede darse sin actividad de los micelios por lo que representaría poca ayuda para aclarar la dinámica de las poblaciones del suelo (Burges, 1960).

#### **2.3.1.2.- Técnica del suelo en placa o de la adición del suelo al medio de cultivo fundido**

Según Burges (1960) la técnica consiste en dispersar una pequeña cantidad de suelo sobre una lámina de medio de agar en una placa de aislamiento. A la hora de llevar a cabo muestras de suelos con elevado número de colonias Johnson y Manka (1961) diluían las muestras con arena estéril. Warkup (1951) prefirió añadir el suelo al agar fundido evitando así la película de agua que rodea a la partícula del suelo depositada en la superficie del agar, que favorece el rápido crecimiento bacteriano en detrimento del desarrollo fúngico. Warkup (1951) llevó a cabo una comparación entre la técnica de adición del suelo al medio fundido frente a la técnica de suelo en placas, concluyendo que los dos métodos daban lugar a la misma estructura fúngica pero las placas de suelo favorecían a las especies de rápido crecimiento presentes en el suelo y en menor número.

La gran ventaja de las placas de suelo estriba en que puede utilizarse con facilidad y rapidez, ya que incorporan todo el suelo, por lo que las placas de suelos con medios selectivos, así como otros sistemas serán de mayor utilidad que las placas de dilución del suelo (Burges, 1960).

**Tabla 6.** Distribución de los hongos más abundantes en los campos de trigo. Comparación de los métodos de dilución en placas (adición del suelo al medio fundido) y del suelo depositado en la superficie del medio agarizado sólido (suelo en placas).

Profundidad de la muestra (cm)	Dilución en placa			Suelo en placa		
	2,54	7,64	15,24	2,54	7,64	15,24
Las 13 especies de hongos más esporógenos	7.343	4.799	1.499	1.427	1.321	1.059
Las 11 especies más abundantes de hongos estériles	23	12	7	8	0	24
República Checa	7.965	5.638	1.899	–	–	–
<b>Número total de especies</b>	<b>87</b>	<b>91</b>	<b>75</b>	<b>70</b>	<b>76</b>	<b>86</b>

**Fuente:** BURGES, (1960), resumido de WARCUP, (1957). Se expresa en número de colonias (Martínez *et al.*, 2009).

Se pudieron identificar géneros tales como *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Fusarium* (Warcup, 1951). Técnica que, además fue utilizada por Tello y Lacasa (1990) para evaluar diferentes suelos cultivados (clavel y tomate) e incultos ( pinares y arenas de playa) de la comunidad de Murcia. Así como también fue utilizado por Rodríguez Molina (1996) para estudiar poblaciones de *Fusarium* en suelos cultivados (cerezo, espárrago, hortalizas) y no cultivados (pinares), permitiendo así una posibilidad comparativa real (Tabla 6).

### 2.3.1.3.- Método de Cambridge y técnica para evaluar el potencial infeccioso de los suelos

Garret (1970) fue el primero en usarlo para estudiar la capacidad saprofitaria de la comunidad fúngica del suelo. Propuso enterrar pajas de trigo en el suelo que se pretendía estudiar, que previamente era diluido en arena esterilizada para tener así diferentes concentraciones de un mismo suelo. “Los cultivos puros, de hongos de los cuales se pretende conocer su habilidad parasitaria, se multiplicaron en una mezcla de arena de cuarzo con el 3% de harina de maíz. Cuando el hongo había colonizado toda la mezcla se mezclaba con el suelo a estudiar sin esterilizar en la proporción deseada. Las proporciones que se recomendaban fueron: 100 (cultivo puro en arena +harina de

maíz), 98, 90, 50, 10, 2 y 0 (solamente suelo no esterilizado). Con las proporciones anteriores se rellenaban recipientes de vidrio y se enterraban, posteriormente, en cada recipiente 50 unidades estandarizadas de sustrato consistente en tejidos de planta muerta. Las unidades (recipientes) se incubaron durante 4 semanas para dar al hongo inoculado un tiempo suficiente para colonizar tantas “trampas vegetales” como fuera capaz en competición con los otros hongos del suelo a estudiar” (Garret, 1970). Una variante de este método fue utilizar plántulas vivas de pepino y harina de avena para medir el potencial infeccioso de *Pythium* en el suelo, propuesto por Bouhot (1980).

Estas técnicas se basan en otras más antiguas consistentes en introducir en el suelo diferentes “trampas” como pelos humanos, portaobjetos con diferentes medios de cultivo que pretendían capturar a los hongos del suelo según sus habilidades nutritivas (descomponedores de quitina, de celulosa, etc.).

Este método presenta diversas limitaciones y resulta un poco complicado utilizarlo para llevar a cabo un análisis de la comunidad fúngica del suelo.

#### **2.3.1.4.- Fitopatometría de suelos**

Mediante la técnica del fitopatómetro es posible evaluar las habilidades saprofitarias de hongos colonizadores y parásitos de las raíces de las plantas.

La técnica para la fitopatometría del suelo consiste en mezclar una proporción de suelo con vermiculita desinfectada en autoclave (60 minutos a 120°C). Distribuir la mezcla en macetas desinfectadas y sembrar semillas germinadas y desinfectadas previamente, de la especie vegetal para la que se deseen conocer los patógenos telúricos que la parasitan. Mantener durante los días que se estimen oportunos para que se expresen los patógenos en condiciones controladas de cámara de cultivo o fitotrón (Martínez *et al.*, 2009).

Es De Cara (2007) quien realiza una serie de comparaciones entre tres tipos de métodos analíticos (diluciones sucesivas con medio acidificado (agar-malta); adición del suelo a un medio selectivo para *Fusarium* (Komada, 1975) y la técnica del fitopatómetro) para abordar cual es el mejor método aislante de hongos.

Una vez obtenidos los resultados se compararon los hongos aislados en los análisis de suelos en agar-malta acidificado con los encontrados en el mismo medio al analizar las raíces de las plantas de melón que permanecieron en el fitopatómetro durante 45 días. En ambos casos se pueden encontrar los mismos géneros, sin embargo, en las raíces de las plantas aparecieron hongos que no se aislaron en el análisis de suelo (*Pythium* (*P. aphanidermatum* y *P. deliense*), *Monosporascus cannonballus*, *Olpidium bornovanus* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*) (Martínez *et al.*, 2009). Este hecho se debe, según Martínez *et al* (2009), a que *Pythium* presenta dificultades para expresarse en medios de cultivos agarizados, por ello es por lo que se utilizan trampas vegetales (pétalos maduros de clavel). Para el caso *Monosporascus* podría concluirse lo mismo que para *Pythium*. Por último, los parásitos identificados, *Olpidium* y *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, se concluye que a través de la técnica de las diluciones sucesivas con medio agar-malta no es posible separar formas patógenas de las no patógenas.

Cuando se comparan las especies de *Fusarium* obtenidas en los análisis de las plantas de melón del fitopatómetro con las aisladas utilizando el medio selectivo para *Fusarium*, prácticamente ninguna diferencia puede ser establecida: *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. dimerum* y *F. equiseti* son las mayoritariamente presentes en cualquier suelo analizado, independientemente de su origen (Martínez *et al.* 2009).

### **2.3.2.- Técnicas analíticas no dependientes de medios de cultivo**

Tras haber analizado los diferentes métodos convencionales que existen para establecer una identificación de la comunidad fúngica del suelo podemos observar que cada uno de ellos presenta diversas limitaciones, asociadas a la selección que establecen los sustratos. De esta forma, rigurosamente hablando, no es posible establecer una identificación completa de la comunidad fúngica del suelo a estudiar. Debido a estas limitaciones, la comunidad científica está cambiando los sistemas de identificación hacia los no dependientes de un medio de cultivo. De esta forma, la composición de las comunidades puede ser deducida mediante la extracción, cuantificación e identificación de las moléculas del suelo que son específicas de contener microorganismos o grupos de ellos. Otro sistema no dependiente de cultivo es mediante técnicas de microscopios de fluorescencia, donde las moléculas útiles



para tales estudios incluyen ácidos grasos de fosfolípidos y ácidos nucleicos (Morgan y Winstanley, 1997) mientras que las técnicas microscópicas implican la hibridación de sondas de ácido nucleico marcadas con fluorescencia con el ARN total extraído de los suelos o hibridaciones con células in situ.

### **2.3.2.1.- Técnicas con ácidos nucleicos (Metagenómica)**

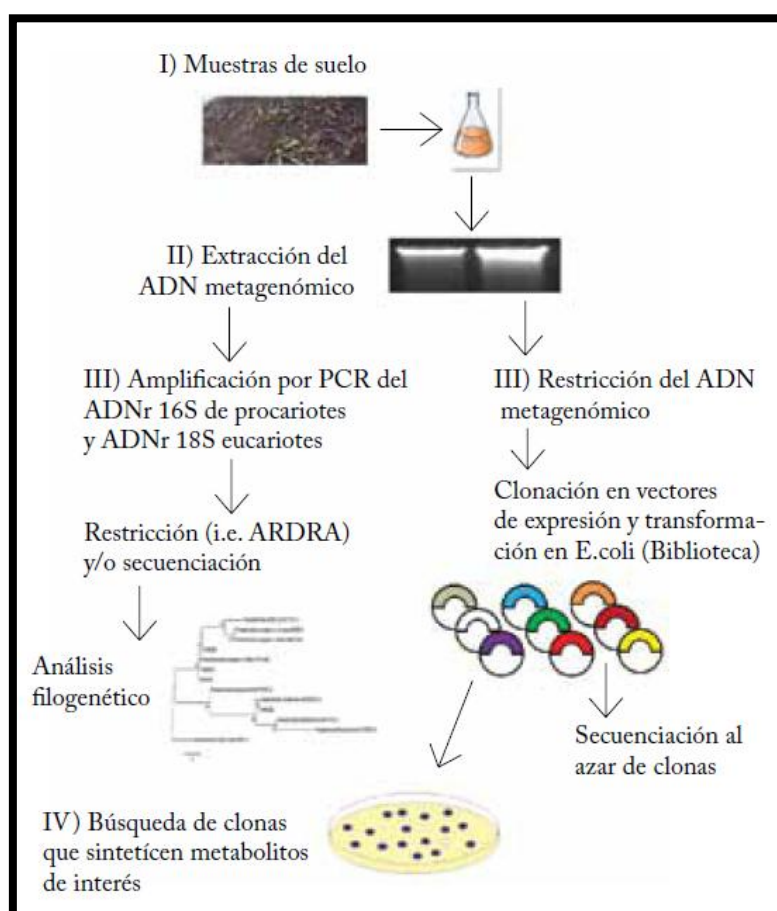
La metagenómica consiste en analizar una muestra a través de la búsqueda de cualquier resto de ADN presente en ella. El metagenoma se puede definir como el total de ADN de una muestra ambiental. Hasta el momento, se han investigado metagenomas de diversos ambientes, incluyendo ecosistemas acuáticos, minas, suelos agrícolas y forestales, entre otros (Rondon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004).

El ADN metagenómico se puede clonar en vectores y expresar en diversos huéspedes procariotes, dependiendo de los objetivos del estudio (Rondon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Todo este material genético podría codificar nuevas o mejores actividades metabólicas. De la misma manera, se pueden emplear métodos de secuenciación masiva que generaran genomas completos de organismos no cultivables (Handelsman, 2004; Tyson *et al.*, 2004).

Una de las técnicas más usadas desde hace algunas décadas es la amplificación de los genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S (ADNr 16S). Este marcador es una poderosa herramienta que ha sido ampliamente usada en clasificaciones filogenéticas, debido a que su secuencia es altamente conservada (Woese y Fox, 1977; Pace *et al.*, 1986; Woese, 1987). La amplificación de los ADNr 16S se realiza por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés, empleando oligonucleótidos o primers específicos. Esto se realiza para amplificar los ADNr 16S de bacterias u otros grupos como arqueobacterias. En el caso de organismos eucariontes, se emplean las secuencias ADNr 18S (Baker *et al.*, 2003). Los 16S posteriormente se pueden clonar en vectores o plásmidos. Dichos vectores son transferidos a bacterias huésped como *Escherichia coli*, para crear bibliotecas o bancos de clones, conteniendo las secuencias ADNr 16S de diversos microorganismos de forma separada. Esto permite el análisis individual de cada una de las secuencias clonadas utilizando

diversos métodos, tales como secuenciación, restricción de los 16S ribosomales con nucleasas (ARDRA), etc. (Escalante-Lozada *et al.*, 2004) (Hernández-León *et al.*, 2010).

A la hora de analizar un suelo, en primer lugar, se aísla el suelo que se desea estudiar (I) y se extrae el ADN metagenómico (II). Posteriormente se puede analizar la diversidad microbiana a través de la amplificación de los genes ribosomales 16S y/o llevar a cabo la restricción del ADN, así como su clonación en vectores (III). Finalmente se realiza la búsqueda de funciones o actividades enzimáticas (IV). (Hernández-León *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Protocolo general de análisis del metagenoma de una muestra de suelo.

**Fuente:** Hernández-León *et al.* 2010.

Uno de los trabajos en el que se utilizó la metagenómica para el análisis de suelos fue el proyecto METACONTROL (Van Elsas *et al.*, 2008). En él se analizaron diferentes tipos de suelos supresivos en los que se encuentran una gran diversidad y variedad de compuestos inhibitorios o antibióticos. Tras su análisis se han identificado diversas

moléculas que muestran actividades antagonistas hacia diversos patógenos, tales como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. y *Pythium ultimum* (Courtois *et al.*, 2003; Ginolhac *et al.*, 2004; Van Elsas, 2010).

### **2.3.2.2.- Análisis de ácidos grasos fosfolípidos**

Este método ha sido muy usado para identificar la comunidad microbiana del suelo en función de cambios asociados a alteraciones en el suelo, como las prácticas culturales, contaminación, fumigación y cambios en la calidad del suelo. Los ácidos grasos de fosfolípidos son ampliamente usados debido a que se encuentran presentes en todas las células. En los microorganismos, los fosfolípidos se encuentran exclusivamente en las membranas celulares. Esto es importante debido a que la membrana celular es rápidamente degradada y los ácidos grasos son rápidamente metabolizados seguidos de la muerte celular. De esta forma, los fosfolípidos sirven como indicadores de la actividad microbiana frente a la biomasa microbiana no viva.

Debe tenerse en cuenta que existen diferentes tipos de moléculas indicadoras y que por lo tanto, cada ácido graso de fosfolípido solo será indicador de grupos específicos de organismos.

### **2.3.2.3.- Técnicas filogenéticas**

El éxito de los métodos para la caracterización de la comunidad microbiana del suelo se basa en el adecuado uso de los análisis filogenéticos, ya que muchos de los organismos identificados mediante estos métodos, probablemente, no hayan sido estudiados previamente. Estos métodos han sido utilizados en el estudio de la ecología microbiana (Woese, 1987).

A pesar de que ADNr y ARNr son usados como caracteres en estos análisis, la lista de caracteres es mucha mayor y puede extenderse desde simples moléculas hasta rasgos morfológicos.

Por otro lado, los análisis filigenéticos son importantes en la identificación de similitudes entre organismos, destacando la posibilidad de conocer la fisiología y ecología de especies todavía no cultivables en laboratorio. A su vez, presenta limitaciones, como por ejemplo, el hecho de que un análisis basado en una única

molécula de lugar a una relación entre taxones no quiere decir que no pueda darse con otra molécula y obtener el mismo resultado (Olsen y Woese, 1993). De la misma forma, al basarse en un sistema taxonómico limitado, es difícil establecer con certeza microorganismos nuevos en base al sistema taxonómico existente. Por lo tanto, los microorganismos identificados mediante técnicas filogenéticas procedentes del estudio de la comunidad microbiana del suelo deben ser interpretados con cuidado.

#### **2.3.2.4.- Hibridación fluorescente in situ (FISH)**

La hibridación de ácidos nucleicos suele ser usada para pruebas específicas en el estudio de la ecología molecular bacteriana (Theron y Cloete, 2000), también se puede utilizar para visualizar los microorganismos del suelo que aún no se han podido cultivar en laboratorio, y es útil en el estudio de la distribución ecológica de microorganismos a lo largo de diversos hábitats (Ludwig *et al.*, 1997). También ha sido usado con éxito en el estudio de la distribución espacial de bacterias en biofilms (Thurnheer *et al.*, 2004). Estas técnicas de hibridación pueden llevarse a cabo mediante extractos de ADN y ARN, así como a nivel celular. El proceso se realiza mediante el llenado de todas las células enteras, su 16S o 23S rRNA es hibridado con sondas de oligonucleótidos asociadas a taxones específicos marcados con fluorescentemente. Posteriormente las células marcadas se observan a través de un microscopio de barrido láser confocal (SCLM).

Sin embargo, surgen aspectos que limitan la técnica., como por ejemplo, en el caso de células con bajo contenido en ribosomas. Una actividad fisiológica de baja frecuencia se correlaciona con un bajo contenido de ribosomas por célula, por lo tanto, células de crecimiento lento o células que mueren de hambre no pueden ser detectadas (Amann *et al.*, 1995). Para superar estas limitaciones que presenta FISH, se ha diseñado una técnica de amplificación a través de una señal de tiramina, la cual permite llevar a cabo análisis a microorganismos de crecimiento lento. También presenta como inconveniente la falta de sensibilidad, siendo fiable cuando las secuencias a analizar se encuentran en un elevado número de copias (Pernthaler *et al.*, 2002).

Por último, FISH presenta dos ventajas frente a las técnicas inmunofluorescentes. En primer lugar, FISH es capaz de detectar microorganismos a través de todos los niveles

filogenéticos, mientras que las técnicas inmunofluorescentes presentan limitaciones en niveles de especies y sub-especies. En segundo lugar, FISH posee una mayor sensibilidad que los inmunofluorescentes debido a que la unión no específica de las partículas del suelo suele darse raramente (Amann *et al.*, 1995).

### **2.3.3.- Técnicas de muestreo para análisis de la comunidad microbiana del suelo**

Tal y como se ha expuesto anteriormente acerca de la recogida de muestras en la que Rodríguez Molina (1996) examinaba una calicata de 1x1x0.8 m y donde encontraba divergencias en los géneros fúngicos encontrados, cabe analizar la enorme complejidad de establecer un patrón común, a través de una serie de muestras, de la comunidad microbiana de un suelo determinado cultivado.

En primer lugar es necesario establecer una distinción de las diferentes zonas del suelo, debido a que autores como Brickman y Campbell (1971) afirman que la población fúngica de la rizosfera difiere tanto cuantitativa como cualitativamente del resto del suelo. Se precisa conocer cuáles son sus condiciones, que diferencias existen entre ellas así como el efecto que provoca, cada una de las partes, en la microbiota edáfica.

Son Pochon y De Barjac (1958) unos de los primeros autores que establecen una distinción entre dos sectores en la rizosfera: en primer lugar establecen una rizosfera alejada, distante, que se puede extender desde algunos milímetros hasta unos 50 cm de la raíz, llamada edafosfera. El otro sector consiste en una rizosfera próxima, capa de tierra en contacto íntimo con las raíces. Se le suele llamar rizoplana o histosfera.

Campbell *et al.* (1971) afirmaron que la rizosfera se trata de una zona que tiene una extensión de algunos milímetros y ejerce sus mayores efectos físicos y químicos sobre los microorganismos en su superficie externa o rizoplano. Asimismo, aseguraban que la población de la rizosfera difiere tanto cuantitativa como cualitativamente del resto del suelo.

Burges (1960) afirma que en los suelos más ricos se muestra poco el efecto de las raíces y la rizosfera, nunca más allá de 1 mm. Por el contrario en los suelos pobres los cambios de la microbiota se pueden comprobar a 10-25 cm de distancia de la raíz. En

trabajos realizados con judías, remolacha y cereales, se comprobó que el incremento de bacterias ocurría a una distancia de 20-22 cm de las raíces, contándose 18 millones a 35 cm y 30 millones a 22 cm, incrementándose las cifras a medida que las muestras se tomaban más próximas a la raíz, hasta alcanzar la cifra de varios cientos de millones en la superficie de la raíz. Esta observación es válida para los suelos de los invernaderos, lo que da lugar a proponer la eliminación del término rizosfera y sustituirlo por el de rizoplana, debido a que la mayoría de los microorganismos se originan en la superficie de la raíz. Sin embargo, fue de mayor aceptación distinguir tres regiones: la superficie de la raíz, la rizosfera y el suelo que está fuera del influjo de la raíz. Desde el punto de vista operativo o analítico, las muestras de rizosfera se toman arrancando la planta con sus raíces y tomar una porción del suelo adherido a ellas, que es el que se utiliza para analizar. Los resultados se expresan por el cociente R/S, donde R es el número de microorganismos aislados en la rizosfera y S el de los aislados del suelo (Martínez *et al.*, 2009).

Tras haber analizado las distintas partes que se pueden dividir en el suelo y sus efectos en la comunidad fúngica, es preciso obtener información acerca del procesado de las muestras y su preparación ya que como se expuso anteriormente influye de forma decisiva. Es Rodríguez Molina (1996) quien lleva a cabo el siguiente estudio, analizado anteriormente:

Para obtener información acerca del tiempo que podía conservarse una muestra antes de analizarla, Rodríguez Molina (1996) concluyó que a mayor tiempo de conservación, la densidad de *Fusarium* en ellas disminuía linealmente. Sin embargo, cuanto mayor era la concentración de especies de *Fusarium* más acusada era esta disminución, por lo tanto, la variación de la población del hongo era función de la muestra.

Para el caso de la repetibilidad trabajó con 18 muestras de suelos, las diferencias de resultados entre dos análisis consecutivos para la misma muestra, las mismas condiciones analíticas, el mismo operador y un corto intervalo de tiempo (8-10 días) entre análisis y análisis, los resultados diferían significativamente de una fecha a otra. Sin embargo se mantenían las tendencias, es decir, la mayor densidad seguía

manteniendo esa primacía. La autora recomienda comparar las tendencias, pero no los valores numéricos absolutos.

Por último, se llevó a cabo un trabajo sobre 42 muestras. En este aspecto se aplicó la misma técnica analítica pero en condiciones diferentes: diferentes analistas, diferentes laboratorios, diferentes aparatos y momentos diferentes. Las diferencias para la misma muestra eran claramente significativas, pero las tendencias, como en el caso anterior, se mantenían. De esta forma se obtuvo información acerca de reproducibilidad de la muestra.

## **2.4.- Composición de la materia orgánica del suelo**

### **2.4.1.- Introducción**

La materia orgánica del suelo consiste, principalmente, en material de origen animal y/o vegetal que ha sido retornada al suelo, ya sea mediante su incorporación como enmienda agrícola o bien mediante el proceso natural de descomposición de los organismos, que conforme van muriendo se acumulan en el suelo. Esta materia acumulada sufre una serie de transformaciones a través de la actividad biológica de los organismos que habitan el suelo. Los procesos que dan lugar a la transformación de la materia orgánica son llamados mineralización y humificación. A través de estos procesos, los restos vegetales y/o animales son transformados en una gran diversidad de compuestos orgánicos de diferentes estructuras químicas, tales como ácidos polifenólicos, azúcares, etc, lo cual en su conjunto se considera como humus. Ambos procesos se encuentran limitados por factores biológicos, climáticos y edáficos. Estos factores van a determinar, por ejemplo, la descomposición del humus en mayor o menor grado, produciendo una serie de productos coloidales que podrán unirse con los minerales arcillosos presentes en el suelo, dando lugar a los complejos organominerales, cuya aglutinación determina la textura y estructura de un suelo. Estos coloides existentes en el suelo presentan además carga negativa lo que da lugar a la absorción de  $H^+$  y cationes metálicos ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) e intercambiarlos en todo momento de forma reversible. Mediante este sistema de flujos de energía a través de los diferentes metabolismos que posee la biota edáfica se abastecen los nutrientes necesarios para las especies vegetales y animales creando los hábitats

necesarios para los organismos vivos del suelo. De forma análoga dan lugar al favorecimiento de la retención de agua del suelo y a la formación de agregados, creando así un sistema dinámico de suelo-planta-organismos en el que cada uno ejerce su papel.

Esta biota edáfica es la que permite la transformación de los diferentes compuestos húmicos existentes, asociados a la materia orgánica de manera que presentan una función imprescindible en la materia orgánica de los suelos. Suelos sanos y por lo tanto más fértiles, donde el contenido en materia orgánica presenta unos niveles altos corresponde con suelos con una gran cantidad de microorganismos. De la misma forma se puede hacer referencia a suelos poco sanos, donde la presencia de microorganismos es muy baja al igual que el contenido en materia orgánica. De esta forma se crea un anexo consubstancial entre la materia orgánica del suelo y los microorganismos que la habitan.

Esta afirmación queda demostrada mediante un estudio realizado por Tello y Lacasa (1990) en el que se observan diferencias en la cantidad de propágulos de *Fusarium* por gramo de suelo seco correspondiente a dos tipos de suelos. Un suelo es de la arena de playa de Murcia, con un porcentaje de materia orgánica cercano al 0%. El otro suelo corresponde con un suelo de invernadero, donde el contenido en materia orgánica oscila entre un 2-3%. Los análisis demuestran, como para el caso del suelo arenoso, la cantidad de propágulos de *Fusarium* es muy inferior a la del suelo invernado, existiendo así una relación materia orgánica-biota fúngica.

La materia orgánica influye en las propiedades físicas, químicas y biológicas de todos los suelos. De esta forma, tanto su composición como su nivel de descomposición, afectan a cualidades del suelo tales como la estructura, la porosidad, la tasa de infiltración del agua, así como el intercambio catiónico de la rizosfera, pH y conductividad eléctrica. También conforman un efecto directo, el cual es imprescindible para elaborar la relación estimada en el proyecto, sobre la diversidad y la actividad biológica de los propios organismos del suelo.

El contenido en materia orgánica de un suelo se establece a través de las entradas de materia orgánica, procedentes de los residuos vegetales procedentes del cultivo o de



la vegetación propia del ecosistema y de la descomposición de la hojarasca así como de los organismos habitantes, pero también los factores de humedad, temperatura, aireación, así como las propiedades físicas y químicas de los suelos determinarán la cantidad de materia orgánica, así como el tiempo empleado en la transformación.

La materia orgánica del suelo está compuesta por una gran variedad de componentes, por ello existen una gran cantidad de clasificaciones basadas en función de unos parámetros u otros.

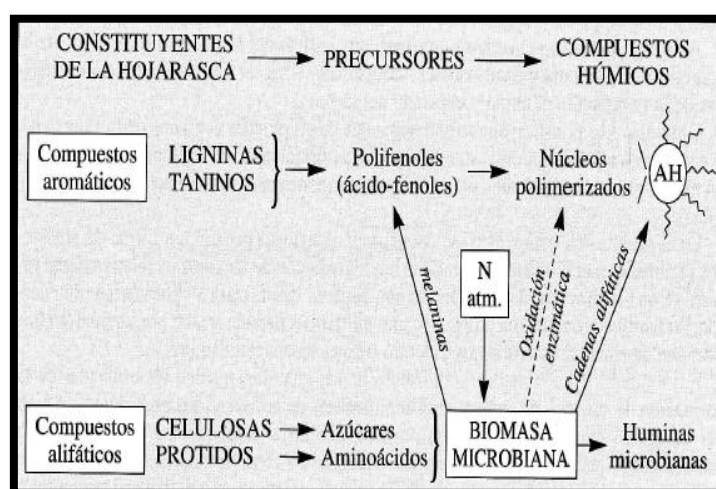
Existe una gran cantidad de bibliografía histórica del estudio de las sustancias húmicas así como su papel en la nutrición vegetal. Ya por el siglo XVIII se realizan ensayos para extraer sustancias húmicas procedentes de turbas, restos vegetales en descomposición y suelos, mediante soluciones alcalinas (Kononova, 1982). Komov (1789) estableció una serie de aspectos relacionados con el papel del humus en la nutrición de la planta y en la creación de un régimen hidro-físico favorable a esta en el ambiente que sirvieron para establecer unos pilares básicos acerca del papel del humus en la nutrición vegetal.

En las primeras décadas del siglo XIX, el científico sueco S. Odén (1919) clasificó las sustancias húmicas en cuatro grupos: carbón húmico, ácido húmico, ácido himatomelánico y fulvoácidos. Esta clasificación se basaba en aspectos como el color y su relación a los disolventes, tales como agua o alcohol, lo cual presentaba grandes deficiencias al ser técnicas deficientes.

El científico A. A. Shmuk llevó a cabo una investigación que estableció unas bases mucho más orientadas a la verdadera naturaleza de las sustancias húmicas, consideradas hasta el momento como sustancias de naturaleza individual. Shmuk (1914-30) consideró a los ácidos húmicos como un grupo de sustancias que poseen características estructurales en común, las cuales las definió como suspensiones altamente dispersas, que están en el límite entre lo coloidal y los cristaloides pero con características típicas de sustancias en estado coloidal. También elaboró un estudio acerca de las formas de nitrógeno de los ácidos húmicos. Shmuk determinó los principales aminoácidos, característicos de las sustancias proteicas, y entre ellos, aminoácidos de naturaleza aromática (indol, scatol y otros). Basándose en que los

compuestos orgánicos nitrogenados procedentes de los restos vegetales son descompuestos rápidamente por los microorganismos, Shmuk determinó que el nitrógeno del suelo tenía su origen principal en el plasma de los microorganismos, demostrando así que los elementos del plasma microbiano establecían una contribución imprescindible en la formación de sustancias húmicas, idea previamente elaborada por Kostichev (Kononova, 1982). Posteriormente se ha demostrado que en las zonas de Europa central, el plasma microbiano constituye, en un año, con hasta 1 t/ha (Tyurin, 1946).

Trusov (1914-16) aportó información muy relevante acerca del origen de las sustancias húmicas, así como su mecanismo de formación. Concluyó que las fuentes que aportaban humus al suelo eran originarias de diferentes sustancias vegetales y de los compuestos utilizados por los microorganismos, tales como la celulosa, hemicelulosa, monosacáridos, disacáridos, ácidos orgánicos, etc. También compuestos como lignina, taninos y aminoácidos aromáticos, los cuáles presentaban una mayor resistencia a la acción microbiana. A su vez estableció los mecanismos de formación del humus, demostrados posteriormente de forma experimental, resaltando su idea acerca de la síntesis de los compuestos (condensación), los cuales se conformaban mediante la participación de fermentos-oxidasas que se encontraban en el organismo de los microorganismos edáficos así como en los tejidos vegetales en descomposición (Trusov 1916, 1917).



**Figura 4:** Esquema de humificación por neoformación (Duchaufour, 1987). **Fuente:** Duchaufour (1987) (Labrador, 1996).

Otras aportaciones importantes fueron las realizadas por Waksman (Kononova, 1982) Se pueden encontrar conclusiones como que las sustancias de fácil descomposición, celulosa, hidratos de carbono simples, etc, establecían un papel poco relevante en la formación de humus. Por lo que eran las sustancias de difícil degradación las que generaban la mayor parte de las sustancias húmicas, tales como la lignina de los tejidos vegetales, así como de las proteínas resintetizadas en forma de plasma microbiano. Ambas fuentes daban lugar a lo que Waksman (1935) llamaba el complejo lignoprotéico y que correspondía con el núcleo del humus.

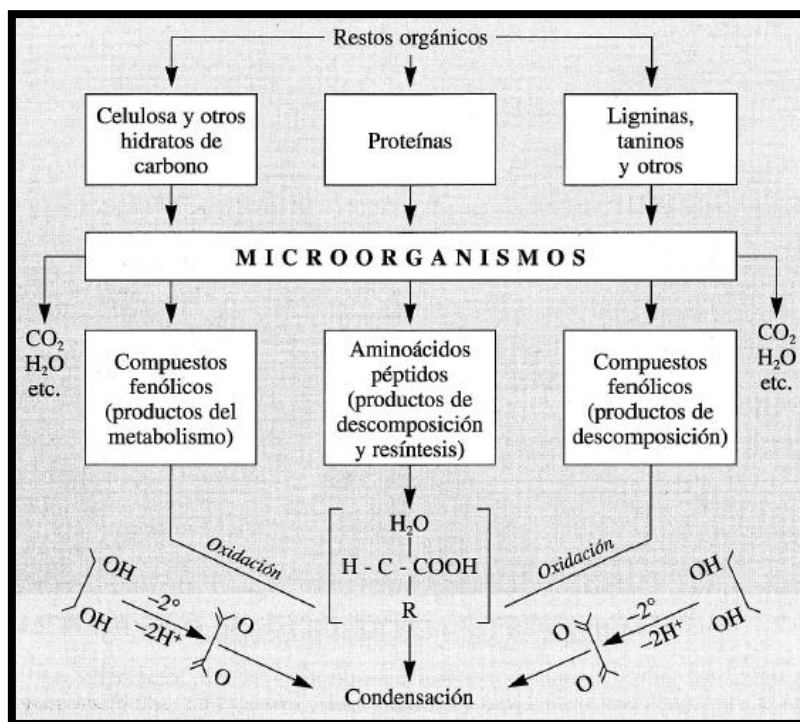
Posteriormente, en torno a mediados del siglo XIX, con la mejora de las técnicas de análisis se establecen una serie de principios irrefutables. Rasgos tales como la estructura de las materias húmicas, desarrollando que su complejidad estructural se atribuye por la participación en la formación de sus moléculas de diversas unidades estructurales, fundamentalmente compuestos aromáticos de carácter fenólico y compuestos nitrogenados. Pero que conservan principios estructurales semejantes, los grupos de ácidos húmicos y de fulvoácidos están ligados por formas transitorias.

Finalmente los últimos estudios fueron orientados hacia la agricultura. Relativos al papel de la materia orgánica en la nutrición vegetal así como su papel en la estructura edáfica y el resto de sus características físicas. Mediante el estudio de la participación de las sustancias húmicas del suelo en los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta, se elaboró la posibilidad de aportar compuestos orgánicos de naturaleza individual a la planta de forma que intervengan en los procesos de respiración y metabolismo vegetal, intensificando así el desarrollo de la planta y evitando fertilizantes de síntesis, poco eficientes energéticamente hablando. De esta forma se dio la posibilidad de crear un entorno edáfico biológicamente activo con rendimientos elevados.

#### **2.4.2.- Clasificación de las sustancias húmicas**

Al hablar de sustancias húmicas hacemos referencia a la fracción humificada de la materia orgánica del suelo, la cual pertenece a los productos de descomposición avanzada de los residuos orgánicos, transformados biológicamente, así como otros productos originados de procesos físico-químicos y de síntesis microbiana. Dentro de

estas sustancias húmicas podemos encontrar a los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, himatomelánicos y huminas (Labrador, 1996). Este complejo de compuestos orgánicos presenta una variedad de colores que van desde el color marrón, pardo, hasta el amarillo.

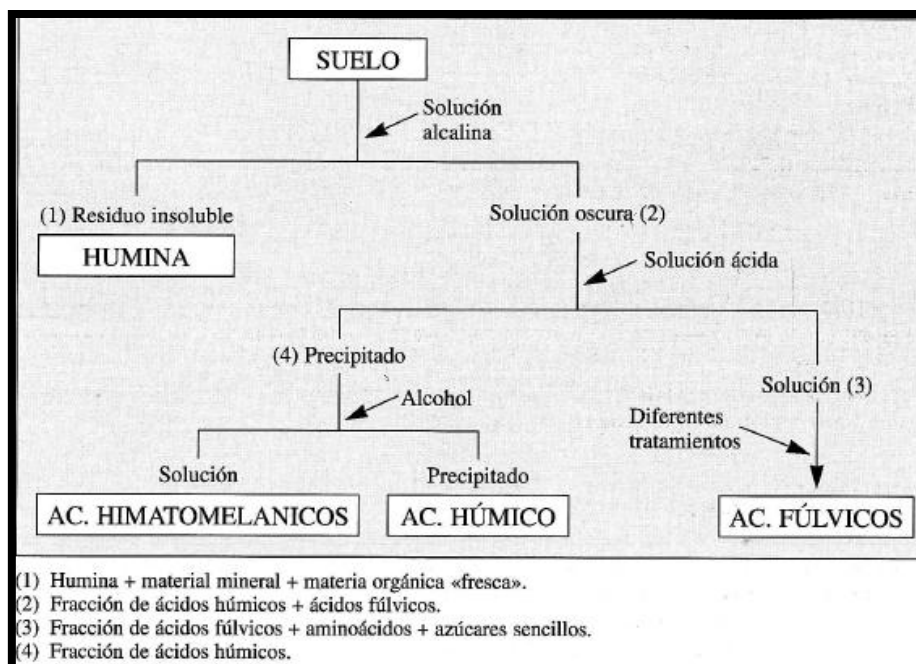


**Figura 5:** Esquema de formación de sustancias húmicas. **Fuente:** Kononova (1982) (Labrador, 1996).

Cuando se habla del proceso de humificación se considera como un proceso formado por una serie de secuencias progresivas en el cual se evoluciona desde los ácidos fúlvicos a los húmicos y de los húmicos a huminas. Esta secuencia está caracterizada por un aumento en la estabilidad de sus moléculas, una disminución progresiva de las estructuras biomoleculares y alifáticas más lábiles así como a un aumento en las estructuras aromáticas, las cuales presentan una mayor complejidad, dando lugar a macromoléculas, con una mayor resistencia a la biodegradación.

Estas macromoléculas húmicas están constituidas elementalmente por estructuras condensadas de naturaleza aromática, polifenoles y quinonas, las cuales presentan una relación con los compuestos de naturaleza alifática (Labrador, 1996).

La clasificación se va a basar en dos parámetros: color y comportamiento a los disolventes, es decir, la solubilidad que presentan las sustancias húmicas en medios ácidos y básicos, dividiéndose, por regla general, en tres fracciones. Al utilizar reactivos alcalinos aparecen los ácidos fúlvicos, los cuales no precipitan en medios ácidos después de su extracción, y también los ácidos húmicos que precipitarán posteriormente como flóculos de color pardo en medio ácido. El resto de compuestos que no precipitan bajo ningún medio corresponden con las huminas, con una composición química muy variable. También podemos clasificar derivados de los ácidos húmicos, solubles en alcohol y denominados ácidos himatomelánicos.



**Figura 6:** Fraccionamiento de la materia orgánica por métodos analíticos clásicos.

**Fuente:** Labrador (1996).

#### 2.4.2.1.- Ácidos húmicos

Los ácidos húmicos corresponden al grupo que engloba a las materias extraídas mediante disolventes como NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, urea, oxalato sódico, etc y que posteriormente acidificando el medio precipitará en forma de gel oscuro.

Estas materias extraídas presentan ligeras variaciones en sus composiciones elementales y propiedades las cuales son atribuidas a la propia naturaleza de cada uno de los componentes que constituyen los ácidos húmicos, de los que surgen el ácido úlmico, múmico, fumínico y otros, pero que a pesar de sus divergencias siguen una conformación estructural primaria común (Kononova, 1982).

La estructura de la macromolécula húmica corresponde a la de las sustancias húmicas en general, pudiendo encontrar macromoléculas complejas constituidas por estructuras de carácter aromático, asociadas a aminácidos, péptidos, ácidos alifáticos y otros compuestos orgánicos (Almendros *et al.*, 1983; Stevenson y Shnitzer, 1982). Esta forma de la estructura molecular húmica se asocia a su importancia en la actividad de la formación de la estructura del suelo. Al presentar una estructura molecular flexible y ramificada con una gran cantidad de cavidades internas será determinante en la

absorción de agua en el suelo. El estado de humificación de la materia orgánica es un factor muy importante debido a que regula el potencial formador de complejos órgano-metálicos. A mayor humificación, mayor potencial para formar complejos y viceversa.

Los grupos ácidos de carácter hidroxifenólico o carboxílico (-OH, -COOH) que encontramos en los radicales externos determinan las propiedades ácidas de los ácidos húmicos y su posibilidad para formar complejos, lo cual adquiere interés para la génesis del suelo, así como en la formación de una buena estructura y en la disponibilidad y movilidad de determinados nutrientes (Schnitzer, 1990). También presentarán un importante papel en la persistencia y degradación de plaguicidas en el suelo.

Referente al nitrógeno de los ácidos húmicos, la bibliografía especializada lo considera como una parte importante de los ácidos húmicos y del que constituye entre el 3.5-5% del contenido total. A su vez, se encuentran también gran diversidad de aminoácidos asociados a esta parte nitrogenada de los ácidos húmicos (Schmuk, 1924). Estos aminoácidos se pueden determinar mediante la hidrólisis de los ácidos húmicos. Otros autores obtuvieron formas cíclicas de nitrógeno del tipo indol. También podemos encontrar aminoácidos aromáticos, tales como purinas, pirimidinas (Anderson, 1958; 1961). La mayoría de los autores estiman que el contenido de aminoácidos en los ácidos húmicos tiende a ser homogéneo en la mayoría de los tipos de suelos (Kononova, 1982). En relación con el contenido de nitrógeno hidrolizado en los diferentes tipos de ácidos húmicos (chernoziom, podzol y fulvoácidos de chernoziom) se encuentran diferencias. Estas diferencias se asocian a la posición que ocupa el nitrógeno en las moléculas húmicas. Los ácidos húmicos del chernoziom son los más resistentes a la hidrólisis, ya que el nitrógeno se encuentra estructurado, en su mayoría, de forma cíclica y en menor medida en los enlaces que unen los núcleos aromáticos así como en las cadenas periféricas. Para el caso de los ácidos húmicos del podzol y de los fulvoácidos, el nitrógeno se encuentra estructurado como las dos últimas formas y en menos medida en forma de compuestos cíclicos.

Por la tanto, la posición que ocupa el nitrógeno en las cadenas estructurales de las moléculas de ácidos húmicos determinará la facilidad de acceso para los microorganismos y, por consiguiente, a la planta.

Por último y referente a la estructura de las moléculas de los ácidos húmicos, Thiele y Kettner (1953) mantienen que los ácidos húmicos son sustancias polímeras coloidales, compuestas de unidades poliestructurales (polímeros), constituidas por unidades monoestructurales (monómeros) y en última instancia formadas de unidades microestructurales, conformadas de un núcleo, una cadena-puente y grupos reactivos.

#### **2.4.2.2.- Ácidos fúlvicos**

Los ácidos fúlvicos, término acuñado por Oden, el cual observó diferencias con los ácidos húmicos en aspectos como la coloración, argumentando que los fúlvicos presentaban una coloración más clara. También estableció diferencias en el contenido en carbono, un 55% menos que los húmicos y en el de oxígeno, entre un 44-49% más que los húmicos. Se estableció que los ácidos fúlvicos destruían la parte mineral del suelo, especialmente los silicatos (Kononova, 1982). Presentaban, a su vez, una buena solubilidad en agua, alcohol y minerales alcalinos y ácidos.

Su extracción se lleva a cabo, al igual que los húmicos, con reactivos alcalinos, pero no precipitan en medio ácido tras su extracción. Su estructura se asemeja a la de los ácidos húmicos excepto en la presencia de una unidad nuclear, estructuras aromáticas de carbono, poco pronunciada con un mayor predominio en las cadenas laterales. El predominio asociado a la relación de estructuras aromáticas/cadenas laterales les da una mayor solubilidad respecto a los húmicos (Labrador, 1996).

Fueron Tyurin (1940) y Ponomareva (1947, 1949) quienes aportaron gran información acerca de la naturaleza, propiedades y papel en el desarrollo del proceso de formación del podsol de los ácidos húmicos. Según sus datos, los fulvoácidos pertenecen al grupo de los ácidos hidrocarboxílicos. Cuando se les realiza la hidrólisis ácida forman sustancias reductoras y furfural. Presentan alta capacidad de cambio (700 meq/100g de sustancia) (Kononova, 1982) y son propensos a formar compuestos complejos con  $R_2O_3$ , con una gran capacidad de movilidad. De esta forma presentan una mayor capacidad destructiva sobre los minerales. También son muy ricos en polisacáridos,



osaninas y aniones minerales como fosfatos. Al presentar ese elevado contenido de cargas aniónicas posee una gran actitud para formar complejos estables con cationes polivalentes ( $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ , etc.) haciendo que flocule a pH neutro o un poco ácido (Holzclaw *et al.*, 1976).

Al igual que los ácidos húmicos, cuando se lleva a cabo una hidrólisis ácida en los ácidos fúlvicos obtenemos cantidades de nitrógeno. Fue Bremmer (1954) (Kononova, 1982) quien al hidrolizar los ácidos fúlvicos obtuvo entre el 20-30% de nitrógeno en la solución donde descubrió una gran cantidad de aminoácidos, muchos de ellos próximos a los húmicos. Cabe resaltar la elevada movilidad del nitrógeno en los fúlvicos.

Como conclusión acerca de los ácidos fúlvicos y su gran analogía con los ácidos húmicos, se deduce que se caracterizan por la presencia de una fracción nuclear poco pronunciada (rejillas aromáticas del carbono) con predominio de cadenas laterales.

#### **2.4.2.3.- Huminas**

Las huminas corresponden con la fracción insoluble de las sustancias húmicas extraídas mediante pirofosfato sódico. Tiene un bajo contenido en humus y una baja capacidad de reacción (Porta, 2003).

Considerada como producto de envejecimiento de los ácidos húmicos (Fuentes, 1999), se puede encontrar en el suelo en diferentes estadios como: Humina microbiana, que está formada por metabolitos microbianos y por compuestos alifáticos que derivan de ellos; huminas heredadas, próxima a la materia orgánica fresca; humina neoformada, que es el resultado de procesos de inmovilización por los cationes y no es extraíble por reactivos alcalinos; y finalmente la humina estabilizada, que resulta de la evolución lenta de los ácidos húmicos que provoca la polimerización de los núcleos aromáticos y un descenso de su solubilidad ante los reactivos de extracción (Duchaufour, 1984; Labrador, 1996).

Al estudio de la naturaleza de las huminas del suelo están dedicadas detalladas investigaciones de Tyurin y Gutkina (1940). Ellos han demostrado que, si el residuo del suelo, después de la extracción de los ácidos húmicos solubles en álcali, se trata con

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> o HF, para romper los enlaces de las sustancias húmicas con silicatos, después de este residuo, que contiene huminas, al tratar con soluciones alcalinas se extraen de nuevo ácidos húmicos.

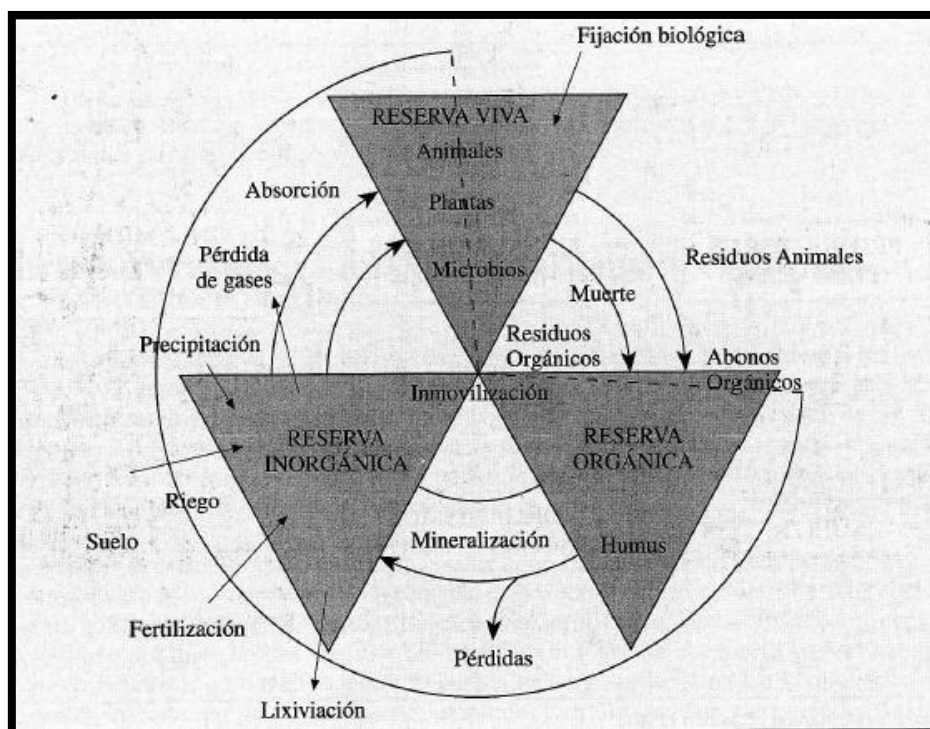
#### **2.4.3.- Efecto de las sustancias húmicas en la estructura edáfica**

Es importante establecer un análisis sobre el papel que tiene la materia orgánica, así como el efecto de las sustancias húmicas y no húmicas, en la calidad y fertilidad de los suelos. Tradicionalmente la fertilidad de los suelos agrícolas ha estado siempre asociada a su contenido en materia orgánica, pero con la intensificación del uso de los suelos, a través de una agricultura intensiva unido a sistemas de monocultivo con un uso indiscriminado de fertilizantes de síntesis ha dado lugar a que surjan problemas asociados a pérdidas en los contenidos de materia orgánica provocando disminuciones en la producción así como en la propia fertilidad del suelo.

Como es sabido, los suelos agrícolas mediterráneos poseen, generalmente, bajos contenidos en materia orgánica que tienden a disminuir debido a las pérdidas que se producen por mineralización de la misma, a las labores agrícolas, a la relativa poca importancia actual del estercolado, así como al empleo preferente de abonos minerales de origen industrial. Esta disminución de la materia orgánica de los suelos se traduce en un deterioro de las propiedades físico-químicas de los mismos, así como en su mayor erosionabilidad, con la consiguiente pérdida de productividad a medio y largo plazo (Barón *et al*; 1995). Estas prácticas están convirtiendo paulatinamente la agricultura tradicional en un ejercicio de tendencias claramente insostenibles. Por ello, la utilización de materia orgánica está sobradamente justificada.

Debido a estas consecuencias se ha comenzado a establecer una visión más holística del suelo, considerándolo como un agrosistema en el que intervienen una gran cantidad de factores en la fertilidad y calidad del suelo y entre los cuales la materia orgánica establece una destacable función. A su vez, la fertilidad no va a considerarse únicamente como la capacidad para aportar nutrientes minerales esenciales para la planta, si no también, como la capacidad que tiene el suelo para mantener unos niveles productivos altos de forma sostenible y con una diversidad biótica elevada a través de un equilibrio dinámico (Labrador, 1996).

De esta forma, la influencia de la materia orgánica en los parámetros que determinan la fertilidad será los desarrollados a continuación.



**Figura 7:** Esquema de la dinámica de los ciclos de nutrientes. **Fuente:** White (1987); (Labrador, 1996).

#### 2.4.3.1.- Efecto en las propiedades físicas

##### ❖ Estabilidad estructural

La materia orgánica interviene de forma decisiva en las propiedades físicas del suelo. Diversos autores, tales como Fortún y Fortún (1989), Benito, Díaz Fierros (1989) y Kay (1997) mantienen que los agentes cementantes de naturaleza orgánica, así como los de naturaleza inorgánica, intervienen en los procesos de formación de agregados del suelo, en los cuales es preciso la floculación de las arcillas y su posterior estabilización. De esta forma las sustancias húmicas actúan como cemento de unión de las partículas minerales, aportando una mayor ligereza a los suelos arcillosos, favoreciendo la porosidad, la aireación y la circulación del agua. También ocasionan la compactación de los suelos arenosos estabilizando los agregados (Labrador, 1996). Asociado a esta formación de agregados por parte de la materia orgánica, cabe señalar el papel realizado, tanto por las raíces de las plantas mediante la acción mecánica y exudados,

como por las sustancias procedentes del metabolismo microbiano, totalmente ligados a la materia orgánica de los suelos.

Esta relación entre la cantidad de materia orgánica de un suelo y su estabilidad estructural ha sido demostrada por autores tales como Kay (1997) y Hayes y Himes (1994). Los resultados obtenidos en un ensayo demostraron la relación existente entre la estabilidad de los agregados del suelo y la cantidad de materia orgánica extraída experimentalmente a través de pirofosfato. A su vez se confirmó que las sustancias menos oxidadas y de mayor peso molecular son las que se asocian más fuertemente a la fracción mineral del suelo aportando así estabilidad estructural al suelo. De la misma forma las enmiendas orgánicas aumentan la estabilidad de los agregados del suelo y el poder de agregación de las sustancias enmendantes queda determinada por su velocidad de descomposición y de la cantidad de componentes que pueden descomponerse. Fortún y Fortún (1989), fundamentándose en Tisdall y Oades (1982), clasifican a los agentes orgánicos enlazantes, en base a su persistencia en transitorios, temporales y permanentes. Cabe resaltar los transitorios y permanentes ya que están asociados a los microorganismos edáficos y a las sustancias húmicas respectivamente.

Los agentes enlazantes transitorios corresponde con materiales que se descomponen rápidamente por acción de los microorganismos. El grupo más importante es el de los polisacáridos, entre los que destacan la glucosa, la arabinosa y la xilosa, procedentes de tejidos vegetales, la glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, fucosa y los ácidos urónicos procedentes del metabolismo bacteriano y la N-acetil glucosamina, procedente de la actividad fúngica (Kögel-Knabner, 2002).

Para el caso de los agentes enlazantes permanentes se corresponden con sustancias húmicas, de naturaleza aromática, degradados y asociados con hierro, aluminio, o aluminosilicatos para formar la denominada fracción organo-mineral del suelo. Blair *et al.* (1997) indican que los agregados con tamaños comprendidos entre los 20  $\mu\text{m}$  y los 250  $\mu\text{m}$  están formados por partículas inferiores a los 20  $\mu\text{m}$  enlazados por materiales orgánicos persistentes (ácidos húmicos y fúlvicos), óxidos cristalinos y aluminosilicatos altamente desorganizados.

### ❖ **Permeabilidad y capacidad de retención de agua**

La materia orgánica en un suelo aporta una mayor permeabilidad al agua y al aire debido a que promueve la porosidad al influir directamente sobre la fauna edáfica. Un estudio llevado a cabo por Urbano Terrón (1988) determinó que el efecto hidrófobo de los coloides húmicos provocaba un aumento en la capacidad de retención del agua. De esta forma, permite almacenar más agua en estaciones con mayores precipitaciones y reducir la pérdida hídrica mediante la evaporación. Por lo tanto las sustancias húmicas llevan a cabo una alteración en el balance hídrico del suelo. Pero es necesario esclarecer que, a pesar de llevar a cabo técnicas de manejo que proporcionen un aumento de materia orgánica libre particulada no tienen por qué suponer un incremento en el contenido de agua disponible para las plantas, aunque incrementa de manera absoluta el contenido de agua del suelo (Kay, 1997).

#### **2.4.3.2.- Efectos en las propiedades químicas**

El efecto de la materia orgánica en las propiedades químicas del suelo se divide en los siguientes parámetros.

### ❖ **pH**

El pH está considerado como uno de los factores más importantes en el condicionamiento de la fertilidad del suelo debido a su capacidad para alterar la presencia o no de nutrientes, haciendo que no sean disponibles para las plantas o cantidades tóxicas. Por ejemplo, un pH excesivamente ácido va a retener la disponibilidad de nutrientes imprescindibles, tales como P, Ca y Mg y pone a disposición elevadas cantidades de Al y Mn que son fitotóxicas. A su vez la nitrificación, como consecuencia de indiscriminados aportes de fertilizantes nitrogenados, conlleva a pH muy elevados (Haynes y Mokolobate, 2001).

Una de las funciones principales que la materia orgánica realiza en el pH del suelo es el poder amortiguador que le confiere, haciendo que los cambios de pH sean menos bruscos. A través de la edafogénesis, muchos suelos comienzan a acidificarse. Mediante este proceso geoquímico se produce una mezcla de cationes básicos (Ca, Na, Mg, K) de forma que si la acidificación continúa comenzará otro proceso de aumento de cationes acidificantes tales como Al, Fe, Mn y H, los cuales, pueden ocupar las

posiciones de cambio del complejo coloidal. En el caso de los suelos ácidos, estos últimos cationes pasan a la solución del suelo, donde la gran abundancia de compuestos alumínicos y la hidrólisis de los cationes de aluminio en el rango de pH entre 4,5 y 6,0 hacen de este elemento, junto con los grupos funcionales anfóteros de la materia orgánica, el tampón más importante de los suelos en condiciones naturales (Skyllberg, 1999).

Además de regular el pH, los grupos funcionales anfóteros de la materia orgánica afectan a la solubilidad y a la hidrólisis del aluminio debido a la capacidad que tienen para formar complejos de alta estabilidad con este elemento. Como ocurre en otras ocasiones, podemos dividir la materia orgánica que reacciona con el aluminio y otros cationes, para formar complejos, en dos grandes grupos: compuestos tales como ácidos orgánicos alifáticos, ácidos fenólicos, polifenoles o azúcares ácidos y un segundo grupo de materiales húmicos.

Otro efecto que la materia orgánica aporta al pH del suelo sería el poder que tiene para neutralizar pH ácidos. Existen al menos seis teorías sobre el efecto neutralizante de la acidez proporcionado por el aporte de material vegetal (Marschner y Noble, 2000; Haynes y Mokolobate, 2001):

- Reacciones de intercambio con bases proporcionadas por el material vegetal
- Protonación de los ácidos orgánicos añadidos
- Descarboxilación de los aniones orgánicos
- Desplazamiento de grupos hidroxilo de los sequioxidos por aniones orgánicos
- Amonificación de residuos de nitrógeno
- Reacciones de reducción del Fe y del Mn en condiciones especiales

#### ❖ **Capacidad de intercambio catiónico**

La capacidad de intercambio catiónico de un suelo está determinada por la composición de su complejo absorbente. Las sustancias húmicas, constituidas por una gran cantidad de grupos funcionales (-COOH, -OH, etc.) tienen una alta capacidad de cambio aumentando la potencialidad para la absorción y el intercambio iónico del suelo. De esta forma el poder de retención de macroelementos ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_3^+$ , etc) aumenta.

## ❖ **Nutrientes del suelo (Macro y micronutrientes)**

### ➤ **Nitrógeno**

El nitrógeno es el único mineral que no puede ser liberado a través de la alteración de los minerales del suelo. En cambio es el nutriente que las plantas precisan en mayor cantidad. La materia orgánica del suelo actúa como reservorio del suelo y generalmente se acepta que hasta un 95% del total del nitrógeno presente en este ecosistema está íntimamente ligado a la fracción orgánica (Labrador, 1996).

Las sustancias húmicas son las que aportan gran cantidad de nitrógeno al suelo. Cada uno de los componentes nitrogenados que aportan estas sustancias a quedado clasificado por Stevenson y He (1990), Schulten y Schnitzer (1998) como nitrógeno insoluble en ácido (11,1% - 15,8%),  $\text{NH}_3$  (18% - 32%), aminoácidos (33,1 % - 41,7%), aminoazúcares (4,5% - 7,4%) y una fracción hidrolizable no reconocible químicamente (HUN) (16,5%- 17,8%).

El balance del nitrógeno en el suelo se equilibra a largo plazo mediante los aportes y las pérdidas, de forma que presenta una elevada importancia a la hora de favorecer o no la inmovilización del nitrógeno y limitar sus pérdidas de forma que contribuya en la formación de sustancias húmicas.

La producción de N disponible para las plantas es un proceso netamente biológico, regulado por variables químicas, físicas y fisico-químicas, por lo que son numerosos los factores que pueden provocar su variación espacial (Hashimoto, Sierra y Barberis, 1989). La fijación del nitrógeno atmosférico, llevada a cabo por microorganismos libres en el suelo o bien ligados simbióticamente a vegetales, consiste en la reducción de la molécula de  $\text{N}_2$  gaseosa a la forma  $\text{NH}_3$ , mediante la catálisis enzimática. El amonio producido reacciona con el glutamato para formar glutamina, forma orgánica en la que pasa al ciclo edáfico, adoptando las formas químicas antes comentadas. El proceso de amonificación o liberación del nitrógeno orgánico se lleva a cabo por numerosos microorganismos del suelo, revirtiendo el proceso anterior, es decir liberando  $\text{NH}_3$ . La siguiente liberación de esta molécula al medio o la asimilación directa por parte del organismo que realiza el proceso dependerá de la relación C/N del sustrato

mineralizado, de manera que, si las necesidades energéticas del microorganismo que lleva a cabo la mineralización son mayores que sus necesidades de nitrógeno, el proceso conducirá a la liberación de amonio que quedará disponible para el resto de los organismos.

Los dos últimos procesos, ambos conducentes a la inmovilización del nitrógeno, pueden ocurrir de forma biológica o abiótica. El amonio es adsorbido por las arcillas u otros elementos cargados negativamente pudiendo quedar definitivamente fijado o bien ser intercambiable. El resto del amonio puede ser directamente utilizado por otros organismos del suelo, quedando inmovilizado o bien puede oxidarse para formar nitritos o nitratos en el proceso conocido como nitrificación, mediado por bacterias tales como *Nitrosomonas* o *Nitrobacter*. Ambas formas del nitrógeno, son directamente utilizables por los organismos y, dada su movilidad, son muy susceptibles de lixiviación. El proceso de nitrificación puede, por último, ser revertido biológicamente (desnitrificación) y puede producir la liberación de óxido nitroso o nitrógeno molecular hacia la atmósfera.

Una fracción significativa de los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo (20% - 35%) queda fijada en forma orgánica durante la primera campaña agrícola a partir de su aplicación. Durante las siguientes campañas, no más del 15% de dicho nitrógeno pasa a disposición de las plantas. Este efecto es debido a la progresiva estabilización del nitrógeno en fracciones húmicas más resistentes a la degradación (Stevenson y He, 1990), para la cual se han descrito dos mecanismos: el ciclo del nitrógeno a través de los procesos de mineralización – inmovilización conduce a la incorporación de N en las melaninas de los hongos. Dichas moléculas tienen muchas de las propiedades de las sustancias húmicas, incluida la resistencia a la descomposición microbiana. El nitrógeno de los aminoácidos, péptidos y proteínas se estabiliza mediante reacciones que involucran a quinonas y a otras sustancias que poseen grupos carbonilo lo que conduce a procesos de polimerización y condensación que lo protegen del ataque microbiano.



### ➤ Fósforo

La mayor parte del fósforo en el suelo está en forma ortofosfato (Frossard *et al.*, 2000) A su vez, la unión de los ácidos húmicos con los aniones fosfato, forma fosfohumatos que impedirá la retrogradación del fósforo (Labrador, 1996).

Las fracciones orgánicas de fósforo en el suelo dependen de forma imprescindible de la actividad biológica del suelo, la cual controla la tasa de renovación del fósforo. Esta tasa de renovación del fósforo puede llevarse a cabo mediante la descomposición de los restos orgánicos, que libera ortofosfatos o fósforo en forma orgánica. También puede darse a través de la inmovilización del fósforo en la biomasa celular o bien por la solubilización de las formas inorgánicas mediante la liberación de agentes quelatantes o de ácidos orgánicos. El fósforo orgánico oscila entre el 20% y el 80% del fósforo total del suelo, y puede ser clasificado en los tres siguientes grupos: inositol fosfato, que constituye aproximadamente el 60% del fósforo orgánico, ácidos nucleicos y fosfolípidos. También existen fosfoproteínas, fosfosacáridos y glicerofosfatos, además de una elevada proporción de compuestos orgánicos fosfatados, no identificados, ligados a minerales arcillosos.

Diversos autores han desarrollado el efecto que tiene la aportación de materia orgánica al suelo en la biodisponibilidad del fósforo para las plantas. Hue (1992) demostró que el aporte de fertilizantes fosfatados presentaba una mayor efectividad cuando eran orgánicos, en especial los que eran capaces de formar una mayor cantidad de ácidos orgánicos. También Haroun y Hernández (1988) expresaron que la adición de enmiendas orgánicas a los suelos puede incrementar significativamente la disponibilidad de fósforo por parte de las plantas.

Haynes y Mokolobate (2001) proponen que este fenómeno es debido a la combinación de los siguientes mecanismos: Liberación de fósforo como consecuencia de la degradación de los restos orgánicos y el bloqueo de las reacciones de retrogradación del fósforo por los mecanismos expuestos anteriormente.

A su vez, es necesario tener en cuenta que las enmiendas orgánicas para el aporte de fósforo deben tener una relación C/P adecuada. Relaciones relativas a C/P>130 no reducen significativamente la sorción del fósforo y, en el caso de que dicha razón sea

muy elevada ( $C/P > 300$ ), pueden provocar el efecto contrario, provocando el aumento de la inmovilización biológica de los fosfatos (Iyamuremye y Dick, 1996).

#### ➤ **Micronutrientes**

La solubilización de micronutrientes a partir de sus formas inorgánicas, mediante mecanismos de complejación es el principal aporte de la materia orgánica a la nutrición vegetal mediante estos elementos (Mackowiak *et al.*, 2001). Por otro lado las sustancias húmicas pueden ser absorbidas directamente por la planta, manifestando un efecto directo sobre su crecimiento (Olmos *et al.*, 1998).

La mayor parte de las sustancias húmicas absorbidas quedan retenidas en la propia raíz, proporcionando unas coloraciones negruzcas o pardas. Sólo una pequeña fracción es promovida hacia los tallos o hacia las hojas y, en estos casos, la movilización de los ácidos de bajo peso molecular siempre es mayor que la de los ácidos fúlvicos y la de estos mayor que la de los ácidos húmicos.

La absorción de estos elementos se puede realizar de forma activa o pasiva, según su peso molecular. Vaughan y Ord (1981) observaron que moléculas húmicas con pesos moleculares inferiores a los 50 000 una tenían la posibilidad de ser absorbidas selectivamente mientras que las moléculas orgánicas con pesos moleculares superiores sólo podían introducirse en los vegetales de forma pasiva.

Por ejemplo, en el caso del hierro, la materia orgánica actúa formando complejos con los iones  $Fe^{+++}$  y  $Al^{+++}$  (Labrador, 1996).

#### **2.4.3.3.- Efectos en las propiedades biológicas**

Tal y como ha sido desarrollado anteriormente, la microbiota edáfica realiza una función clave en la descomposición de la materia orgánica, interviniendo así en los factores físico-químicos del suelo. Como es obvio, la materia orgánica representa la principal fuente nutritiva para el metabolismo microbiano. A pesar de su complejidad, las sustancias húmicas son utilizadas en mayor o menor medida por los microorganismos. Autores de principios del siglo XX ya demostraron la aparición de colonias fúngicas en soluciones de humatos y fulvatos (Kononova, 1982). De la misma forma se fueron demostrando casos en los que los microorganismos utilizaban

elementos de las sustancias húmicas, tales como compuestos de naturaleza aromática, así como de fenoles y derivados. Trabajos realizados por Tauson (1929) demostraron el efecto de la oxidación biológica y el aprovechamiento del ácido benzóico por los microorganismos. Por lo tanto, queda de manifiesto que las diferentes sustancias húmicas son aprovechadas por los microorganismos del suelo y por lo tanto ejercen un papel primordial en la transformación de las sustancias orgánicas del suelo.

Son diversos los efectos que repercuten en las propiedades biológicas del suelo como consecuencia del aporte de materia orgánica.

Los ácidos húmicos regulan el estado oxido-reductor del medio en el que se desarrollan las plantas. De tal forma, cuando el oxígeno comienza a disminuir es facilitada la respiración radicular de la planta en forma de humatos. A su vez, y de forma indirecta, la materia orgánica mejora las propiedades físicas del suelo, favoreciendo la respiración radicular (Labrador, 1996).

Establece también un importante papel en favorecer el intercambio gaseoso. El oxígeno, imprescindible, tanto para las plantas como para los microorganismos edáficos, como para las reacciones de oxidación presentes en la edafogénesis. Otro gas imprescindible consiste en el dióxido de carbono, cuyo origen es de la actividad respiratoria vegetal y microbiana (Duchaufour, 1987). Tras exponerlo anteriormente, la materia orgánica humificada actúa de manera positiva sobre los parámetros físicos favoreciendo la difusión de gases entre la atmósfera interna y externa del suelo, beneficiando así la actividad de la microbiota edáfica aeróbica, responsable de la humificación y mineralización de la materia orgánica, así como de otros mecanismos determinantes en la nutrición vegetal.

Por lo tanto, ante este aumento del intercambio gaseoso, experimentado por el aporte de materia orgánica, se desprenderá así dióxido de carbono en la atmósfera edáfica, acidificará las soluciones del suelo y favorecerá la solubización de compuestos minerales de baja solubilidad, mejorando así la disponibilidad para la planta de diversos minerales, inaccesibles de cualquier otra forma (Kononova, 1982).

Otro efecto importante en los parámetros biológicos del suelo recae en su estimulación de la actividad biológica y del desarrollo vegetal (Tate, 1987). La materia orgánica actuará en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos unidos al desarrollo vegetal. Diversos autores han desarrollado estos efectos en una gran cantidad de ensayos. En esta línea, suelos considerados como activos han presentado una gran variedad de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido pantotónico, riboflavina, biotina, así como, estimulantes de crecimiento vegetal, auxinas, giberelinas, ácidos orgánicos, incluso antibióticos como penicilina o terramicina. Todos estos productos de naturaleza orgánica y de gran importancia para el desarrollo vegetal han sido sintetizados mediante la transformación de los restos vegetales a través de la actividad microbiana (Labrador, 1996).

A su vez, sustancias húmicas en bajas concentraciones han demostrado ser muy importantes en acciones destacables de la rizogénesis, provocando un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, elevando la actividad de los fermentos sintetizantes así como el contenido en clorofila y la intensidad de la respiración. De esta forma activa se equilibra el metabolismo vegetal y el microbiano. A modo de síntesis, los efectos de la materia orgánica en la fertilidad biológica del suelo quedan recogidos en la **Tabla 7**.

**Tabla 7:** Efectos más destacados de la materia orgánica en suelos cultivados.

PARÁMETROS EDÁFICOS	EFFECTOS DE LA MATERIA ORGÁNICA HUMIFICADA
Físicos	Aumento de la capacidad calorífica Suelos más calientes en Primavera Reducción de las oscilaciones térmicas Agregación de partículas elementales Aligera suelos arcillosos y cohesionados arenosos Aumenta la estabilidad estructural Aumenta la permeabilidad hídrica y gaseosa Facilita el drenaje y las labores Reduce la erosión Aumenta la capacidad de retención hídrica Reduce la evaporación Mejora el balance hídrico
Químicos	Aumento del poder tampón Regular el pH Aumenta la capacidad de cambio catiónico Mantiene los cationes en forma cambiante Forma fosfohumatos Forma quelatos Mantiene las reservas de nitrógeno
Biológicos	Favorece la respiración radicular Favorece la germinación de las semillas Favorece el estado sanitario de órganos subterráneos Regula la actividad microbiana Es fuente de energía para microorganismos heterótrofos El CO <sub>2</sub> desprendido favorece la solubilización mineral Contrarresta el efecto de algunas toxinas Modifica la actividad enzimática Activa la rizogénesis Mejora la nutrición mineral de los cultivos

Fuente: Urbano Terrón (1987); (Labrador, 1996).

## 2.5.- Influencia de las prácticas agrícolas en la comunidad fúngica del suelo

El ser humano ha ejercido su influencia en gran cantidad de ecosistemas. En el siglo XX, la humanidad movió montañas y se convirtió por primera vez en un agente geológico importante. El suelo es el espacio en que hemos influido de manera más determinante: hemos degradado y hemos enriquecido el sustrato de la civilización, de modo que algunos suelos no han tardado en perder cualquier capacidad de producción, mientras que otros parecen haber sido por fin capaces de generar, si no cualquier cosa, al menos una gran cantidad de productos. A lo largo de la historia, agricultores y agrónomos de todo el mundo, consciente o inconscientemente, han alterado aspectos químicos, biológicos y físicos del suelo y el laboreo ha reducido las reservas de nutrientes en muchos de los suelos desde principios de la agricultura.

En los agro-sistemas, el flujo de energía es alterado con la intervención humana, estableciendo un régimen de entradas de energía según las necesidades externas al sistema. A su vez, hay que añadir fuentes auxiliares de energía, que pueden ser de origen animal, humano o combustible para así, aumentar su producción. De esta forma, los agro-sistemas se transforman en sistemas abiertos no autosostenibles debido a que se pierde una gran cantidad de energía que no queda acumulada en forma de biomasa para consumo interno del sistema. Estos 'nuevos' sistemas agrícolas (agro-industria) difieren de los naturales en su estructura, su estabilidad y en su funcionalidad, siguiendo un gradiente que responde a la intensidad de la alteración producida y a la capacidad del medio para adecuarse y responder a esa alteración. Estas transformaciones presentan una serie de efectos de carácter ambivalente, pudiendo provocar condiciones de contaminación y degradaciones graves (Labrador, 1996). Estos agro-sistemas se presentan como ecosistemas naturales, como un sistema funcional de múltiples y complementarias relaciones entre los organismos vivos y su medio, es de especial importancia analizar el efecto que tiene la mano humana en el complejo sistema del suelo.

A su vez, en el suelo se establece un complejo entramado de ciclos de nutrientes. En cambio, en los agro-sistemas el ciclo de nutrientes es mínimo y una gran cantidad de elementos son perdidos debido a las extracciones de la cosecha, que finalmente no son repuestos. Únicamente, estas pérdidas son sustituidas por pequeños aportes externos que no presentan una relación adecuada ni en cantidad ni calidad. En este entramado de ciclos, la microbiota edáfica, presenta una enorme importancia a la hora de determinar el movimiento de nutrientes y su distribución, pero ante este balance negativo entre entradas y salidas de nutrientes orgánicos, fomentamos la disminución de diversidad microbiana. Por lo tanto, es de especial importancia favorecer las condiciones que establezcan una riqueza microbiana en los agro-sistemas, debido a que, esta pérdida de biodiversidad y reducción de las interacciones tróficas desencadena un panorama en el que las poblaciones son raramente regulables y la gran simplificación que lleva unida la pérdida de biodiversidad, aumenta el problema de la aparición de determinadas plagas y enfermedades.

Por lo tanto, podemos establecer una relación directa entre el manejo de las prácticas agrícolas y la microbiota edáfica de la explotación. Rodríguez Molina (1996), estudió las relaciones existentes entre el tipo de cultivo (cerezo, esparrago, tabaco, etc.) o cubierta vegetal que soporta el suelo y las poblaciones de *Fusarium* que se encuentran en el suelo. Dicho trabajo presenta las diferencias encontradas en las unidades formadoras de colonia en función del cultivo. Los valores más altos se encontraron en cultivos de cerezo. Para el caso de las muestras de cultivo de tabaco, la que presentó un valor mayor fue tomada de una parcela en la que se acababa de enterrar rastrojo como enmienda orgánica. A su vez, suelos que habían presenciado rotación de cultivos se caracterizaban por tener una mayor diversidad de géneros fúngicos.

A su vez, diversos trabajos han abordado el efecto de las prácticas agrícolas en la comunidad microbiana del suelo (Bonanomi *et al.*, 2009; Pérez-Brandán *et al.*, 2013). En todos ellos se puede observar el efecto negativo presente en explotaciones intensivas con un manejo de monocultivo durante más de diez años consecutivos, sin realizar aportes de materia orgánica. Estos efectos negativos se traducen en una reducción del carbono de la biomasa microbiana (MBC), por sus siglas en inglés, la estabilidad de agregados, así como el contenido en materia orgánica, imprescindible para un suelo saludable. También se observaron aumentos en las incidencias de enfermedades en suelos donde se practicaba monocultivo respecto a un sistema de rotación y aumentos en la población de agentes de biocontrol (*Trichoderma spp.*, *Gliocladium spp.*, *Pseudomonas fluorescense*) en suelos rotatorios. También se ha llevado a cabo el estudio sobre el efecto que tiene el laboreo en la materia orgánica del suelo, así como en la microbiota fúngica del mismo. En este estudio, elaborado durante veintitrés años consecutivos, se demostró como el empleo del laboreo convencional reducía considerablemente la cantidad de carbono orgánico, repercutiendo, así, negativamente en la microbiota fúngica, la cual depende de ella para su desarrollo en el suelo (Handayan, 1996).

También los aportes de materia orgánica han sido propuestos como sistema de control para enfermedades del suelo (Baker y Cook, 1974; Hoitink y Fahy, 1986). Se han obtenido diversos resultados asociados a la capacidad supresora de enfermedades del suelo. Lumsden *et al.*, (1983) para el caso de *Aphanomyces euteiches*, Lodha (1995)

obtuvo una disminución en la presencia de *Macrophomina phaseolina*. Papavizas y Davey (1960) para la especie *Rhizoctonia solani*. También se produjo una supresión en especies más influyentes como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Phytium*, *Sclerotinia* y *Sclerotium* (Szczzech, 1999; Szczzech y Smolinska, 2001; McKellar y Nelson, 2003; Lumsden *et al.*, 1983; Covendry *et al.*, 2005)

Por lo tanto, es de especial importancia tener en cuenta el efecto de las prácticas agrícolas para tener un suelo más autosuficiente y no dependiente de ingentes cantidades de productos para regularlo.

## **2.6.- Índices de diversidad de especies fúngicas en el hábitat edáfico**

A la hora de abordar el estudio de la diversidad de especies de un ecosistema es preciso analizar en primer lugar, en qué consiste la biodiversidad. Como biodiversidad se conoce, según Hernández *et al.*, (2004), a la variación genética y la variabilidad de formas de vida de la Tierra y los ecosistemas en que se encuentran. La biodiversidad puede caracterizarse de genes, especies y ecosistemas a través de una relación inmutable. El concepto de especie resulta clave para estudiar la diversidad. Está considerado como la unidad básica para aplicar el concepto de biodiversidad, a través de la nomenclatura binomial de Linneo.

Por otro lado podemos considerar a la diversidad específica, aquella no dependiente del número de especies de un ecosistema, sino también del número de individuos de cada especie. Por último, la diversidad de ecosistemas, formada por una comunidad de organismos y el medio físico en el que viven, estableciendo una serie de relaciones entre los habitantes del ecosistema así como con los factores físico-químicos que condicionan las características del ecosistema. Estas relaciones funcionales entre la comunidad y su ambiente son complejas, pero existen procesos ecológicos universales que proveen el sostenimiento de estos ecosistemas. A su vez, las relaciones ecológicas se establecen en emplazamientos físico-químicos, conjuntos de sustancias del medio abiótico, que podemos considerar, para este caso, el sistema abiótico suelo, entre los que se encuentran elementos inorgánicos simples, así como compuestos, tales como oxígeno, agua, carbonatos, fosfatos y toda una serie de compuestos orgánicos, subproductos de la actividad orgánica (la materia orgánica). En este substrato abiótico



(el suelo) se establecen las interacciones bióticas entre los componentes del sistema planta-animales-microorganismos basadas en flujos energéticos, formando, de esta forma, lo que se denomina como ecosistema (Kormondy, 1973).

A su vez, la diversidad microbiana del suelo está compuesta por una gran cantidad de especies y de diferencias genéticas. La diversidad de especies se ha basado en riqueza de especies, total de especies presentes, equitatividad de especies, así como en la distribución de especies (Øvreas, 2000). Sin embargo, la definición tradicional de especies siempre estuvo basada en animales y plantas, sin tener en consideración, a los organismos procariontes (Godfray and Lanton, 2001) ni a los organismos asexuales. La diversidad microbiana ha sido considerada como el número de individuos referentes a diferentes taxones y a su distribución dentro del taxón. De forma consecuente, los microorganismos se han asociado como colectivos en grupos funcionales. El estudio de la diversidad microbiana ha incluido la diversidad de comunidades a través de gradientes de estrés, alteraciones, así como diferencias bióticas y abióticas (Hugles *et al.*, 2001).

En el estudio de la biodiversidad de ecosistemas se utilizan una serie de parámetros, los cuales nos determinarán el grado de diversidad (Hill *et al.*, 2000). Estos parámetros difieren en función del objetivo del estudio. Podemos encontrar índices que nos determinaran la riqueza específica, donde encontramos el índice de Margalef (1958). También índices indicadores de la diversidad, los cuales incorporan en un solo valor a la riqueza específica y a la equitabilidad. En algunos casos el valor del índice de diversidad estimado puede provenir de distintas combinaciones de riqueza específica y equitabilidad. Es decir, que el mismo índice de diversidad puede obtenerse de una comunidad con baja riqueza y alta equitabilidad como de una comunidad con alta riqueza y baja equitabilidad. Esto significa que el valor del índice aislado no permite conocer la importancia relativa de sus componentes (riqueza y equitabilidad) así como la equitabilidad de una población.

Entre los utilizados en este ensayo encontramos el índice de diversidad de Shannon-Wiener, la riqueza de especies de Margalef, índice de equidad de Pielou, así como el índice de dominancia de Simpson.

### 2.6.1.- Índice de Margalef (1958)

El índice de Margalef va a determinar la riqueza de especies de una comunidad. Esta riqueza consiste en establecer una relación entre el número de especies presentes en la comunidad. A simple vista, parece que un índice apropiado para determinar la riqueza de especies de una comunidad sea, únicamente, el 'número total de especies' (S). Pero es prácticamente imposible enumerar todas las especies de la comunidad, tal y como se ha expuesto anteriormente para el caso del ecosistema edáfico y, como S depende del tamaño de la muestra, es limitado como índice comparativo.

Por lo tanto el índice de Shannon se basa en la relación entre S (número total de especies) y el número total de individuos observados (n) de manera independiente al tamaño de la muestra.

La fórmula del índice de Margalef usada:  $R_1 = S - 1 / \ln(N)$

### 2.6.2.- Índice de Simpson (1949)

Índice de Simpson (1949),  $D_{Si}$ . Fue el primer índice de diversidad usado en ecología, cuya fórmula consta de:

$$D_{Si} = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

$p_i$  = abundancia proporcional de la especie  $i$ ; representa la probabilidad de que un individuo de la especie  $i$  esté presente en la muestra, siendo entonces la sumatoria de  $p_i$  igual a 1.

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

$n_i$  = número de individuos de la especie  $i$

$N$  = número total de individuos para todas las  $S$  especies en la comunidad

El índice de Simpson se deriva de la teoría de probabilidades, y mide la probabilidad de encontrar dos individuos de la misma especie en dos muestras sucesivas al azar sin

reposición. En principio esto constituye una propiedad opuesta a la diversidad, se plantea entonces el problema de elegir una transformación apropiada para obtener una cifra correlacionada positivamente con la diversidad:

$$S_{iD} = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2 = 1 - D_{Si}$$

$S_{iD}$  = índice de diversidad de Simpson que indica la probabilidad de encontrar dos individuos de especies diferentes en dos muestras sucesivas al azar sin reposición. Este índice le da un peso mayor a las especies abundantes subestimando las especies raras, tomando valores entre '0' (baja diversidad) hasta un máximo de  $[1 - 1/S]$ .

### 2.6.3.- Índice de Shannon-Wiener (1949)

El índice de Shannon-Weiner ( $H'$ ), al igual que el de Simpson, va a determinar el grado de diversidad de una población.

Este índice se basa en la teoría de la información (mide el contenido de información por símbolo de un mensaje compuesto por  $S$  clases de símbolos discretos cuyas probabilidades de ocurrencia son  $p_1 \dots p_S$ ). Es uno de los más empleados en ecología de comunidades. En un contexto ecológico, como índice de diversidad, mide el contenido de información por individuo en muestras obtenidas al azar proveniente de una comunidad de la que se conoce el número total de especies  $S$ . También puede considerarse a la diversidad como una medida de la incertidumbre para predecir a qué especie pertenecerá un individuo elegido al azar de una muestra de  $S$  especies y  $N$  individuos. Por lo tanto,  $H' = 0$  cuando la muestra contenga solo una especie, y,  $H'$  será máxima cuando todas las especies  $S$  estén representadas por el mismo número de individuos  $n_i$ , es decir, que la comunidad tenga una distribución de abundancias perfectamente equitativa. Este índice subestima la diversidad específica si la muestra es pequeña.

### 2.6.4.- Índice de Pielou (1969)

Mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor va de 0 a 1, de forma que 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes.

### 3.- Materiales y métodos

#### 3.1.- Características y localización de los invernaderos muestreados

Los invernaderos que fueron muestreados se localizaban en diferentes zonas de la provincia de Granada (Andalucía). En primer lugar se encuentra la zona de Zújar, localidad situada en la parte noroccidental de la comarca de Baza. Posteriormente está la zona de Fornes, una localidad perteneciente al municipio de Arenas del Rey y por último, fue muestreada la zona denominada Costa, correspondiente a la conocida como costa subtropical de Granada e incluye los municipios de Carchuna y Motril, donde se encuentran los invernaderos muestreados (**Tabla 8**).

**Tabla 8:** Distribución del total de las muestras analizadas con su correspondencia en zona (Zújar, Costa y Fornes) y tipo de cultivo (Tomate o Pepino).

Muestra	Zona	Cultivo	Muestra	Zona	Cultivo
14/24-1	Zújar	Tomate	15/4-B2	Costa	Pepino
14/24-2	Zújar	Tomate	15/4-C1	Costa	Pepino
14/24-3	Zújar	Tomate	15/4-C2	Costa	Pepino
14/24-4	Zújar	Tomate	14/17-A2	Costa	Pepino
14/24-5	Zújar	Tomate	14/17-B2	Costa	Pepino
14/24-6	Zújar	Tomate	14/17-C2	Costa	Pepino
14/24-7	Zújar	Tomate	14/17-D2	Costa	Pepino
14/17-A	Costa	Pepino	14/28-A	Fornes	Tomate
14/17-B	Costa	Pepino	14/28-B	Fornes	Tomate
14/17-C	Costa	Pepino	14/28-D	Fornes	Tomate
14/17-D	Costa	Pepino	14/28-E	Fornes	Tomate
14/28-1	Fornes	Tomate	14/28-F	Fornes	Tomate
14/28-2	Fornes	Tomate	15/12-A	Costa	Pepino
14/28-3	Fornes	Tomate	15/12-B	Costa	Pepino
14/28-4	Fornes	Tomate	15/12-C	Costa	Pepino
14/28-5	Fornes	Tomate	15/12-D	Costa	Pepino
14/28-6	Fornes	Tomate	15/12-E	Costa	Pepino
14/28-7	Fornes	Tomate	15/12-F	Costa	Pepino
14/28-8	Fornes	Tomate	15/12-G	Costa	Pepino
15/4-A1	Costa	Pepino	15/12-H	Costa	Pepino
15/4-A2	Costa	Pepino	15/12-I	Costa	Pepino
15/4-B1	Costa	Pepino	15/12-J	Costa	Pepino

### 3.1.1.- Zona de Zújar (Granada)

Esta zona está formada por un conjunto de explotaciones, las cuales presentan un sistema de monocultivo de tomate cherry practicado a lo largo de diez años. Como medio de desinfección de suelo recurren de manera habitual al Dicloropropeno + cloropicrina. Las muestras se caracterizan por una codificación correspondiente al 14/24. Fueron tomadas siete muestras procedentes de diferentes invernaderos, los cuales habían recibido un tratamiento previo de biodesinfección. Cada una de las muestras va enumerada del 1-7 tras su código.

- Muestra 14/24-1: Esta muestra corresponde con la nave 1. Esta nave recibió un tratamiento previo de biodesinfección a base de mostaza, rábano (sembrados a finales de noviembre-principios de diciembre en los bordes de la explotación) y 2.5-3 kg de estiércol. Las muestras se recogieron de dos puntos diferentes. Uno del cuello de planta y la otra entre calles.



**Figura 8:** Detalle de cubierta vegetal de mostaza para incorporación posterior.

- Muestra 14/24-2: Corresponde con la nave 11. Dicha nave recibió el mismo tratamiento que la muestra 14/24-1 de la nave 1. Para la recogida de las muestras se escogió el mismo método que para la 14/24-1.
- Muestra 14/24-3: Recibió una biodesinfección mediante los restos de cosecha de tomate, 2.5-3 Kg de estiércol y DMDS (Dimetil disulfuro).

- Muestra 14/24-4: Esta muestra experimentó una desinfección bajo plástico negro con Agrocelone (aplicado mediante sistema de riego por goteo), estiércol y restos de mostaza. La mostaza fue cortada antes de aplicar el Agrocelone. A su vez, el volumen de mostaza aportado correspondía con la mitad incorporado en la nave 1.
- Muestra 14/24-5: En ella se utilizó el mismo método que la 4 pero sin utilizar Agrocelone. Las muestras fueron recogidas entre las calles.
- Muestra 14/24-6: En esta zona se aplicó un tratamiento con Agrocelone y estiércol (2-3 Kg por m<sup>2</sup>) posteriormente cubierto por plástico negro. Las muestras recogidas correspondían con la línea de plantación.
- Muestra 14/24-7: Esta explotación recibió el mismo tratamiento de desinfección que la 14/24-6 pero sin aplicar Agrocelone. Las muestras fueron recogidas entre las calles.

### **3.1.2.- Zona de Fornes (Granada)**

Las muestras recogidas fueron del entorno de los Bermejales. Se caracteriza por llevar dieciséis años con monocultivo de tomate a excepción de dos muestras. Esta zona está codificada como 14/28 y se llevaron a cabo dos muestreos. El primer muestreo realizado corresponde con una enumeración del 1-8. Estas ocho muestras difieren en el tratamiento previo de desinfección.

- Muestra 14/28-1: Esta muestra fue tomada de una plantación de tomate Cv. Ministar injertado sobre cv. Beaufort cuyo estado fenológico a la hora del muestreo era del segundo ramillete. Las labores realizadas en el invernadero fueron con subsolador y grada de discos. El tratamiento de desinfección que recibió fue a base de mostaza secada previamente (1.8 kg/m<sup>2</sup>) y rábano. También se le añadió 2kg/m<sup>2</sup> de estiércol, de los cuales, un 80% correspondía a estiércol de oveja y un 20% a gallinaza. La muestra fue recogida de la cama de cultivo.
- Muestra 14/28-2: La muestra 2 corresponde con el mismo invernadero pero la muestra recogida procedía del pasillo de la explotación.
- Muestra 14/28-3: Muestra recogida de la cama de cultivo, el cual había recibido el mismo tratamiento que 14/28-1 y 14/28-2 pero sin estiércol en las camas.

Las variedades utilizadas en el cultivo correspondían con cv. Guindo y cv. Beaufort.

- Muestra 14/28-4: Muestra perteneciente al mismo invernadero que la 14/28-3 pero recogida del pasillo.
- Muestra 14/28-5: Esta muestra había recibido un tratamiento desinfectante, únicamente, con estiércol, en las mismas cantidades que 14/28-1. La muestra se recogió de la cama de cultivo correspondiente a tomate cv. Ministar y cv Beaufort y presentaban un estado fenológico con el primer ramillete abriéndose.
- Muestra 14/28-6: Muestra recogida del mismo invernadero que la 14/28-5 pero procedente del pasillo del cultivo.
- Muestra 14/28-7: Esta muestra corresponde con un suelo cultivado con tomate desde 2001 alternándose con pepino en tres ocasiones a lo largo de estos catorce años. El tratamiento de desinfección utilizado se basa en mostaza, rábano y verza, los cuales son añadidos tras su crecimiento en otoño e invierno. Previamente se enterraron las plantas del cultivo de tomate mezcladas con estiércol tras finalizar la campaña. El estado fenológico del cultivo en el momento de recogida era del tercer ramillete abriéndose. La muestra se recogió de la cama de cultivo.
- Muestra 14/28-8: Correspondiente a la misma explotación que la muestra 14/28-7 pero la muestra recogida pertenece al pasillo.

El otro grupo de muestras, correspondiente a un segundo muestreo, presenta una codificación con letras. Tales son, 14/28-A, 14/28-B, 14/28-D, 14/28-E y 14/28-F. Estas muestras pertenecen a un segundo muestreo realizado en la zona de Fornes en explotaciones de manejo ecológico, sin ningún tipo de abono sintético. Cabe señalar que a la hora de llevar a cabo el muestreo, ningún invernadero había iniciado el cultivo. A su vez, en la mañana del muestreo se habían registrado mínimas de 5 °C bajo cero.

- Muestra 14/28-A: Muestra de una explotación la cual había recibido el aporte de los restos de cosecha de tomate y estiércol (1.5kg/m<sup>2</sup>), posteriormente

labrado. A pesar de la dificultad de distinguir las líneas de cultivo se tomaron las muestras correspondientes a la carilla.

- Muestra 14/28-B: Esta muestra procede de la misma explotación que 14/28-A. Las muestras se recogieron del pasillo central, el cual nunca había recibido cultivar alguno, únicamente el aporte de estiércol anteriormente cuantificado.
- Muestra 14/28-C: Muestra de una explotación que experimentó un aporte de estiércol y su enterramiento de los restos de cosecha de tomate de la anterior campaña. Había mostaza plantada cuyo estado fenológico presentaba unas nueve hojas verdaderas. La muestra fue recogida de la rizosfera de la zona de la mostaza.
- Muestra 14/28-D: Esta muestra corresponde al suelo desnudo de la explotación 14/28-C, sin presencia de mostaza.
- Muestra 14/28-E: Muestra de otra explotación con aporte de estiércol y posterior labrado. Presentaba mostaza al inicio de crecimiento.
- Muestra 14/28-F: Muestra de explotación labrada previamente. La muestra fue recogida de una serie de puntos cuya única divergencia era espacialmente.

### 3.1.3.- Zona Costa (Carchuna-Motril. Granada)

Esta zona muestreada se caracteriza por invernaderos cultivados con pepino. En ella se difieren distintos muestreos llevados a cabo en diferentes espacios temporales.

En primer lugar se llevó a cabo el muestreo codificado como 14/17 clasificado de A-D. En este primer muestreo se observaron zonas del cultivo afectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumeris*.

- Muestra 14/17-A: Muestra recogida de la zona del gotero afectada por *F.O.* f. sp. *radicis-cucumeris*.
- Muestra 14/17-B: Muestra recogida de la zona del pasillo afectada por *F.O.* f. sp. *radicis-cucumeris*.
- Muestra 14/17-C: Muestra procedente del gotero sin incidencia de *F.O.* f. sp. *radicis-cucumeris*.
- Muestra 14/17-D: Muestra del pasillo de la parte no afectada por *F.O.* f. sp. *radicis-cucumeris*.



Un año más tarde se llevó a cabo un segundo muestreo de las mismas explotaciones. Tras ese año se había realizado una biodesinfección, hacía tres meses, mediante el aporte de mostaza, rábano y estiércol. También fueron modificadas las líneas de cultivo, después de catorce años seguidos. No se observaban síntomas de presencia de *F.O. f. sp. radicis-cucumeris*.



**Figura 9:** Detalle de restos vegetales sin descomponer.

- Muestra 14/17-A2: Al igual que la muestra anterior (14/17-A) fue recogida de la zona del gotero.
- Muestra 14/17-B2: Muestra recogida del pasillo, el cual no había recibido aporte de materia orgánica.
- Muestra 14/17-C2: Muestra precedente de la zona del pasillo sin aporte de materia orgánica.
- Muestra 14/17-D2: Muestra de una zona con presencia de plantas y la cual había recibido aporte de materia orgánica correspondiente a la biodesinfección.

La muestran expuestas a continuación corresponden con la zona de Costa y, al igual que el resto de las muestras procedentes de Costa, presentaban cultivo de pepino.

Estas muestras van a ser clasificadas en función de los diferentes invernaderos muestreados.

- Invernadero 1: Este invernadero se caracteriza por presenciar treinta años de monocultivo sin llevar a cabo ningún aporte de materia orgánica. Tras la campaña anterior, previamente al muestreo, se realizó una incorporación de mostaza, rábano y los restos de la cosecha anterior en las carillas de siembra. Procedente a este invernadero se recogieron dos muestras: 15/12-A y 15/12-B.
- Invernadero 2: En este invernadero se lleva haciendo monocultivo de pepino durante quince años sucesivos. Tras la campaña anterior se adicionó mostaza y estiércol sin los resto de cosecha en las carillas de la plantación. En el momento del muestreo se encontraban las plántulas recién trasplantadas sin presencia de podredumbre de raíz y cuello que tuvo los años anteriores a la adición de materia orgánica. De este invernadero se obtuvieron dos muestras. 15/12-C procedentes a la línea del cultivo y la 15/12-D entre carillas.
- Invernadero 3: El invernadero 3, a su vez, está compuesto por otros dos invernaderos que llamaremos 3.1 y 3.2. Ambos se caracterizan por realizar monocultivo a lo largo de cuarenta años y sin llevar a cabo ningún tipo de aporte de materia orgánica.
  - Invernadero 3.1: De este invernadero se recogieron dos muestras. La 15/12-E precedente de la línea de cultivo y 15/12-F entre líneas.
  - Invernadero 3.2: Este segundo invernadero recibió un retranqueo en la campaña anterior. En él se recogieron otras dos muestras. 15/12-G de las líneas de cultivo y 15/12-H entre líneas.



**Figura 10:** Detalle de la estructura y estado del suelo del invernadero 3.1.

- Invernadero 4: Caracterizado por llevar veinticinco años de monocultivo sin aportar materia orgánica, el último retransqueado realizado data de 1990. Desde el año 2005 lleva cultivando en el suelo, posteriormente usaba perlita. Se recogieron dos muestras, una de la línea de cultivo (15/12-I) y otra entre líneas (15/12-J).

Por último fue muestreada una zona caracterizada por la presencia de *F.O. f. sp. radices-cucumeris* y que había sido muestreada años anteriores. En cada una de las explotaciones se aplicaron biodesinfecciones de diversa índole.

- Muestras 15/4-A(A-1 y A-2): Estas muestras corresponden a una explotación que llevaba quince años de cultivo. Durante estos quince años se sucedieron cultivos de tomate y pepino. A su vez realizó cambios en la localización de las carillas. Tras la campaña anterior realizó un aporte a base de mostaza, rábano y estiércol, únicamente en las carillas. La muestra 15/4-A-1 corresponde a la línea de cultivo y la 15/4-A-2 entre calles.
- Muestras 15/4-B (B-1 y B-2): Este invernadero presentó el mismo aporte orgánico que las muestras anteriores, así como la secuencia de cultivos a lo largo de los años. Llevaba de dos a tres años sin cambiar las carillas. Se obtuvieron dos muestras, 15/4-B1 de la línea de cultivo y la 15/4-B2 de la calle.

- Muestras 15/4-C(A-1 y A-2): Este invernadero lleva cultivándose de veinte a veinticinco años. Desde hace cinco años lleva haciendo monocultivo con pepino y tenía una importante incidencia de F.O. f. sp. radicis-cucumeris. Este invernadero, a diferencia del resto, recibió un tratamiento, únicamente, con metham-sodio y DD. Las muestras recogidas fueron 15/4-C1 del cultivo y 15/4-C2 de entre líneas.

### 3.2. Determinación del porcentaje de materia orgánica de los suelos

El contenido en materia orgánica de las muestras se obtuvo mediante el método de combustión húmeda de Walkley y Black (1934). Consiste en la oxidación con dicromato potásico y ácido sulfúrico. El dicromato potásico residual es valorado posteriormente con sal de Mohr. Los cálculos finales dan como resultado el porcentaje de materia orgánica de los suelos.

Los materiales utilizados para llevar a cabo la valoración fueron:

- Frasco Erlenmeyer de 500 mL.
- Pipeta de 10 mL.
- Dosificadores de 10 y 20 mL.
- Bureta de 50 mL.
- Balance Analítico.
- Agitador magnético.
- Lámpara incandescente.

A su vez, los reactivos utilizados en el método se enumeran a continuación:

- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) – Ácido Fosfórico.
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  [96%] – Ácido Sulfúrico.
- NaF - Fluoruro Sódico (sólido).
- 0.167M  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  – Disolver 49.04g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  secado a 105°C en agua.
- Solución de 0.5M  $\text{Fe}^{2+}$  - Disolver 196.1 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)6\text{H}_2\text{O}$  en 800mL de agua que contiene 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y diluir hasta 1L. El  $\text{Fe}^{2+}$  en esta solución se oxida lentamente al exponerse al aire por lo que debe ser contrastado con el dicromato.

- Indicador férrico – Disolver lentamente 3.71 g de fenantrolina y 1.74 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 250 mL de agua.

El procedimiento a seguir para la determinación del porcentaje en materia orgánica de las muestras de suelo recogidas fue realizado en diez pasos:

1.- Se pesó 0.1-2.0 g de suelo seco para cada muestra de suelo (tamiz < 60mm) y fueron introducidos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. La muestra debe contener entre 10-25mg de C orgánico y entre 17-43mg de materia orgánica. Para una muestra de suelo de 1 g equivaldría con un porcentaje en materia orgánica de 1.2-4.3%. (Se tiene que usar un máximo de 2g de muestra para suelos de color claro y 0.1g para suelo orgánicos (color oscuro)).

2.- Añadimos 10 mL de 0.167 M  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  mediante una pipeta.

3.- Posteriormente se añadieron 20 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado mediante un dosificador y se agitó suavemente para homogeneizar la dilución (se debe tener cuidado al agitar el matraz para evitar que fragmentos de materia orgánica queden adheridos a las paredes).

4.- Se dejó reposar la dilución durante 30 minutos (los frascos deben ser colocados en una almohadilla de aislamiento térmica durante este tiempo para evitar una rápida pérdida de calor).

5.- Luego se diluyó la suspensión con 200mL de agua para proporcionar mayor claridad a la muestra y facilitar su visualización final.

6.- Se añadieron 10 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%), mediante un dosificador, y 0.2 g de NaF. El  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y NaF se introdujeron al complejo  $\text{Fe}^{3+}$  el cual interferirá en la valoración final.

7.- Añadimos 10 gotas de indicador ferrico. El indicador se debe añadir justo antes de la valoración para evitar la desactivación por absorción de la superficie de las arcillas.

8.- Posteriormente se procedió a valorar con 0.5M de  $\text{Fe}^{2+}$  hasta que viró a un color burdeos. Al inicio, el color de la solución va de amarillo-naranja a verde oscuro, en función de la cantidad de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  quede sin reaccionar, el cual cambia a un gris oscuro

antes del viraje y luego cambia bruscamente a un rojo vino al final de la valoración. El uso de un agitador magnético y una luz incandescente hace que el viraje sea más fácil de identificar dada la turbidez de la solución.

9.- Se realizó un reactivo en blanco utilizando el mismo procedimiento anterior pero sin añadir una muestra de suelo para así estandarizar la solución de  $\text{Fe}^{2+}$ .

10.- Por último se calculó el %C y el % en materia orgánica.

➤ % de C orgánico fácilmente oxidable:

$$\%C = (B-S) \times M \text{ de } \text{Fe}^{2+} \times 12 \times 100/\text{g de suelo} \times 4000$$

B = mL de solución de  $\text{Fe}^{2+}$  usado en la valoración en blanco.

S = mL de solución de  $\text{Fe}^{2+}$  usado en la valoración de la muestra.

12/4000 = peso miliequivalente de C en g.

Para convertir C orgánico fácilmente oxidable a C total, se dividió por 0.77 (también se puede multiplicar por 1.30 u otro factor de corrección determinado experimentalmente). Para convertir C orgánico total a materia orgánica se utilizó la siguiente ecuación:

➤ % de materia orgánica

$$\%M.O. = \% C \text{ total} \times 1.72 / 0.58$$

### 3.3.- Estudio de la comunidad fúngica del suelo

#### 3.3.1.- Muestreo

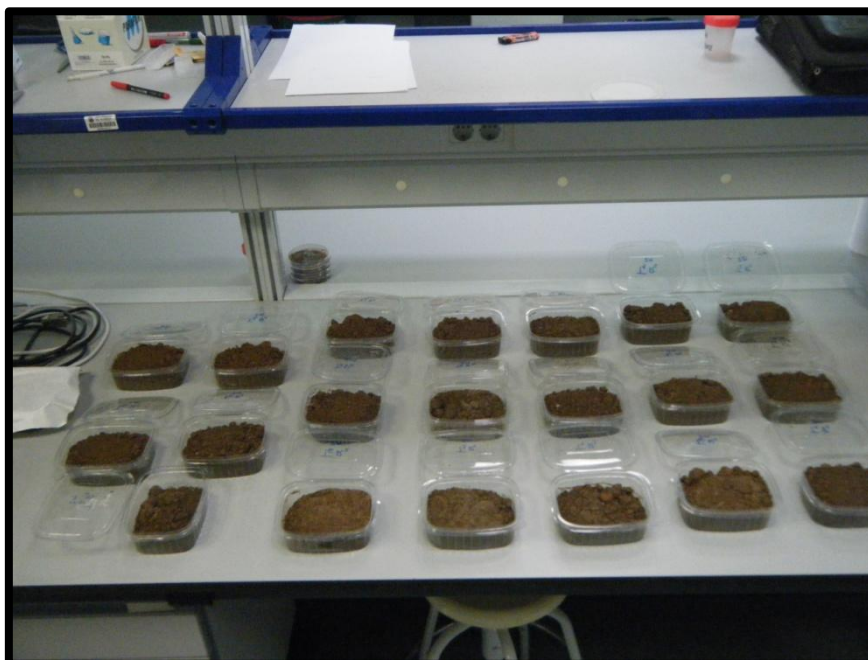
Los muestreos se realizaron siguiendo una distribución espacial determinada, con la intención de obtener una muestra lo más homogénea posible. Así, con ayuda de una pala, las muestras de aproximadamente 2 kg, fueron tomadas a una profundidad de 0 a 30 cm, de tres puntos diferentes dentro de las líneas de cultivo o del pasillo, y posteriormente mezcladas y homogeneizadas en una misma bolsa. Los muestreos se realizaron en el centro de las líneas de cultivo o pasillo, para evitar el posible “efecto borde” del pasillo entre líneas de cultivo.



**Figura 11:** Detalle del muestreo de un invernadero con aporte de materia orgánica.

### 3.3.2.- Preparación de las muestras en laboratorio

Una vez recibidas del invernadero las muestras en el laboratorio, se colocaron en bandejas de plástico cubiertas con papel de filtro secante.



**Figura 12:** Detalle secado de muestras en laboratorio.

Posteriormente se procedía a la mezcla del suelo, de forma que quedara lo más homogénea posible, eliminando las piedras que hubiera y desmenuzando los posibles terrones formados, provistos de guantes para cada muestra. Siguiendo las indicaciones de Tello y Lacasa (1990), Tello *et al.* (1991) y Rodríguez Molina (1996), las muestras se sometieron a un proceso de desecación, trituración y tamizado. La desecación se hizo a temperatura ambiente durante un tiempo variable (entre 7 y 10 días) según la humedad que presentase la muestra a su llegada al laboratorio.

Para la trituración, se empleó un mortero de porcelana y para el tamizado, un tamiz de 200  $\mu$ m de luz. Tanto el mortero como el tamiz se lavaban y se desinfectaban entre muestra y muestra flameándolos con alcohol.



**Figura 13:** Detalle del proceso de triturado con mortero de porcelana



**Figura 14 y 15:** Detalles del proceso de tamizado de muestras.



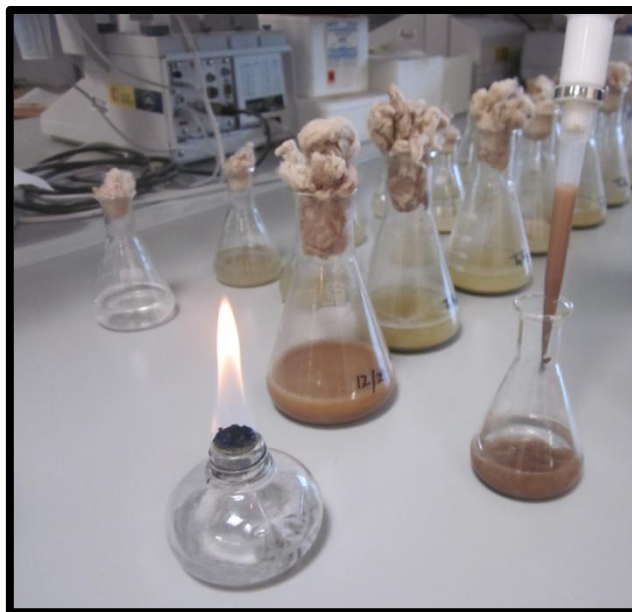
### 3.3.3.- Análisis de la comunidad fúngica total

Para llevar a cabo el análisis de la comunidad fúngica total se utilizó la técnica de las diluciones sucesivas (Tello *et al.* 1991). Esta técnica es la más utilizada para la determinación de la microbiota edáfica total dado su mayor efectividad frente a otras técnicas analizadas anteriormente.



**Figura 16:** Detalle preparación diluciones sucesivas

De cada muestra de suelo se añadieron 10 g a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de agua estéril. Se agitó manualmente para homogeneizar la suspensión y se tomaron, con una pipeta, 5 ml que fueron incorporados a un frasco con 45 ml de agua estéril conformando la dilución de rango  $10^{-2}$ . De esta nueva dilución, se cogen 5 ml y se añaden a otro frasco con 45 ml de agua estéril; de esta forma se ha obtenido la dilución  $10^{-3}$ . Se prosigue hasta el nivel de dilución deseado, que en este caso fue de  $10^{-4}$  ya que las muestras de suelo quedaban así bien representadas, a excepción de catorce muestras, llevadas hasta  $10^{-3}$  debido a que diluido a  $10^{-4}$  no era posible identificar ningún tipo de hongo.



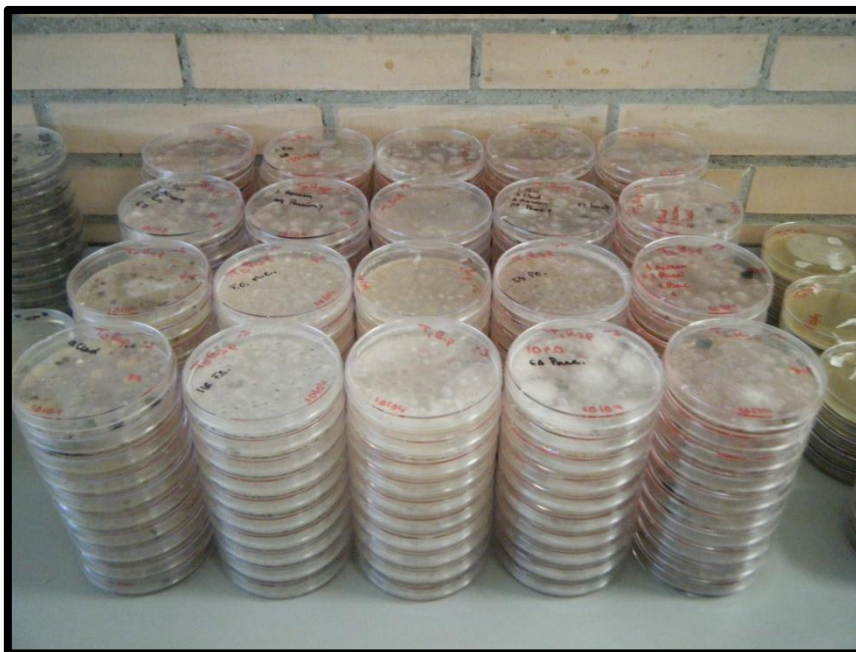
**Figura 17:** Detalle proceso diluciones sucesivas

Una vez que las diluciones están ya preparadas, se analizan 10 ml repartidos en 10 placas de Petri a razón de 1 ml-placa<sup>-1</sup>. La operación se desarrolla así: con una pipeta estéril de 1 ml se toma ese volumen y se añade a una placa de Petri estéril. A continuación, se añade a cada placa de Petri 10 ml de medio agar-malta acidificado fundido (10 g de Agar y 10g de Malta en 1000 ml de agua esterilizados en autoclave 30 minutos a 120°C, a lo que se le añaden al enfriarse hasta 42-43°C, 0.25 g de ácido cítrico por 1.000 ml de agar-malta). Con unos suaves movimientos, se uniformiza el suelo en el volumen agregado de medio.



**Figura 18:** Detalle medio de cultivo (agar-malta).

Por último la incubación se realizó a temperatura ambiente en el laboratorio durante 5-7 días.



**Figura 19:** Detalle proceso incubación en laboratorio

Tras el periodo de incubación se procedió a la identificación morfológica a nivel de género de las colonias de hongos crecidas en cada una de las placas de petri haciendo uso para ello del microscopio.



**Figura 20:** Detalle de las colonias crecidas en una placa petri tras el periodo de incubación

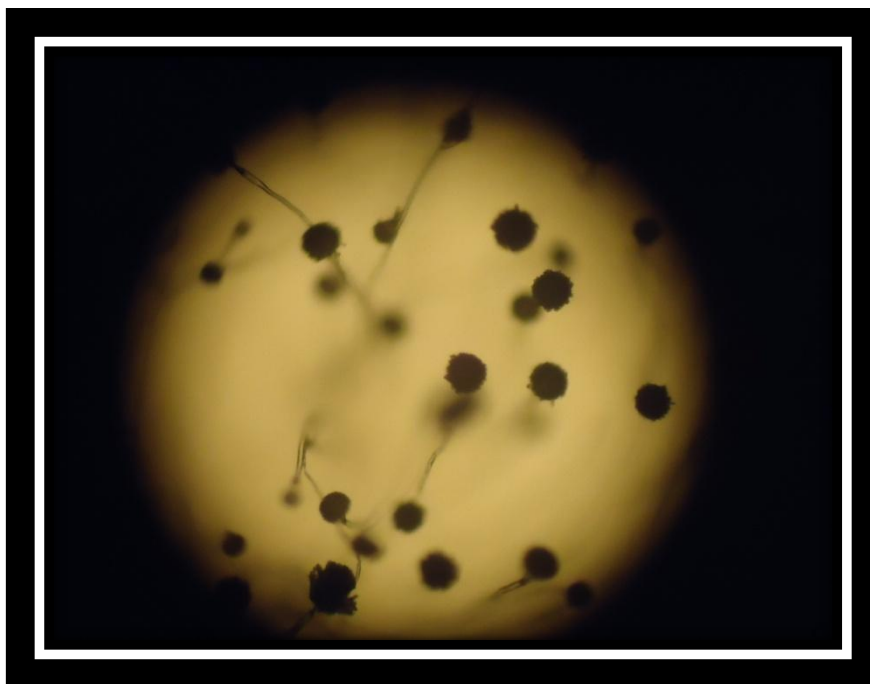


Figura 21: Detalle de estructuras de *Aspergillus* sp. al microscopio

### 3.4.- Cálculo de índices de biodiversidad

Con los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos, obtenidos mediante el método descrito por Tello *et al.*, (1991), se calcularon los índices de biodiversidad. Tal y como se ha descrito en la revisión bibliográfica, los índices utilizados en este estudio han sido:

- Número total de géneros (S), basado únicamente en la diversidad de géneros, independientemente del número de individuos que haya de cada especie en la muestra. Su cálculo se basa en sumar el número de géneros encontrados en cada placa de Petri y/o muestra.
- Número total de individuos (N): Se tiene en cuenta el número total de individuos de cada género.
- Índice de Margalef (d): Determinante de la riqueza de géneros de una muestra, basado en el número total de géneros presente en una muestra. Se calcula mediante la fórmula:  $d_{Mg} = (S-1)/\ln(N)$ : Donde S será el número total de géneros y N el número total de individuos.
- Índice de Pielou (J): indicador de la equitabilidad de una muestra. Mide la probabilidad de que en una muestra, la cantidad de individuos de los diferentes géneros presentes sea el mismo, obteniendo así la máxima equitabilidad (1) o

que en la muestra, todos los individuos presentes sean del mismo géneros, obteniendo así el mínimo valor de equitabilidad (0).  $J' = H' / \log_2 S$ ; donde  $H'$  es el índice de Shannon y  $\log_2 S$  determina la diversidad máxima ( $H'_{\max}$ ).

- Índice de Shannon (H): Establece la incertidumbre existente en predecir a que géneros pertenecerá un individuo elegido al azar en una muestra de S géneros y N individuos.  $H' = -\sum p \times \ln(p)$ ; Por lo tanto, cuando  $H'=0$  significa que la muestra contiene únicamente a un solo género y  $H'$  será máxima cuando todos los géneros S estén representados por el mismo número de individuos  $n_i$ .
- Índice de Simpson (1- $\lambda$ ): Basado en la probabilidad de encontrar dos individuos de especies diferentes en dos extracciones sucesivas al azar sin reposición.  $D_{SI} = \sum p_i^2$ ; donde  $p_i$  consiste en la abundancia proporcional del *i*ésimo géneros, representa así, la probabilidad de que un individuo del género *i* esté presente en la muestra, siendo entonces la sumatoria de  $p_i$  igual a 1. A su vez  $p_i = n_i/N$ .

### 3.5.- Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio, los suelos estudiados fueron agrupados en tres categorías distintas: Zona de procedencia (Costa, Zújar y Fornes), contenido en porcentaje de Materia Orgánica ( $0 \leq 1.5$ ,  $1.5 \leq 3.0$ ,  $3.0 \leq 4.5$  y  $> 4.5$ ) y tipo de cultivo (Tomate y Pepino). Posteriormente, se han comparado los resultados obtenidos mediante 2 vías:

- **Análisis univariantes y bivariantes clásicos de los** distintos parámetros e índices clásicos que determinan de manera numérica la riqueza y diversidad de una población determinada, en nuestro caso la población de hongos incluidos en suelos agrícolas bajo invernadero. En éste caso, para las variables evaluadas, con el fin de testar diferencias significativas entre las distintas categorías que incluyen a los suelos considerados en este estudio, se realizaron, tanto análisis de la varianza (ANOVA) como la prueba t-Student, en función del número de elementos incluidos en cada categoría. Al tratarse de análisis paramétricos se comprobaron previamente las asunciones de normalidad y homocedasticidad. Asimismo, también se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, para medir el grado de covariación entre las distintas variables en función del

contenido en materia orgánica. El paquete estadístico usado fue Statgraphic Plus 5.1 (Manugistic Incorporate, Rockville, MD, USA) para Windows.

- **Análisis multivariantes:** que consideran tantas variantes como géneros fúngicos identificados en los suelos analizados, y que, en principio, permiten identificar de manera más precisa la relevancia y/o contribución de cada género sobre la población total incluida en el mismo. En éste caso, en primer lugar se recurrió a la transformación de los datos de Hellinger (raíz cuadrada de la abundancia relativa) para generar la matriz de disimilitud de Bray-Curtis (+1), así como un análisis de similaridad (ANOSIM) para evaluar si las distintas muestras albergaban diferencias en sus comunidades fúngicas. La contribución promedio de las unidades individuales de muestreo (*i.e.* UFC de cada género de hongos) a las distancias totales de Bray-Curtis se estimó mediante análisis del porcentaje de similitud (SIMPER) a partir de las comparaciones por pares. Así mismo, los resultados son mostrados mediante Escalamiento Multidimensional No Métrico (MDS o NMDS), que es una técnica multivariante de interdependencia que trata de representar en un espacio geométrico de pocas dimensiones las proximidades existentes entre el conjunto de suelos estudiados en función de su microbiota fúngica. Esto nos permite detectar de manera gráfica posibles gradientes en las comunidades fúngicas. El paquete estadístico usado fue el software PRIMER-6 (Primer-E Ltd, 239 Plymouth, U.K.) para Windows.

De ésta manera se pretendía determinar si las nuevas herramientas estadísticas que incluyen modelos matemáticos ideados para el estudio de la ecología de los organismos incluidos en ecosistemas concretos, nos aportaban un conocimiento más profundo y determinante que nos ayude a comprender mejor la ecología de los hongos en suelos sometidos a prácticas agrícolas.

## 4.- Resultados

### 1.- Porcentaje de materia orgánica de los suelos

Tal y como se ha desarrollado en los materiales y métodos, tras la recogida de las muestras de suelo y su posterior tratamiento se dispuso a realizar la determinación del porcentaje en materia orgánica de las 44 muestras de suelo recogidas en las diferentes zonas. Los porcentajes obtenidos son los que aparecen en la **Tabla 9**.

**Tabla 9:** Porcentaje de materia orgánica del total de las 44 muestras recogidas en las zonas de Fornes, Zújar y Costa, obtenido mediante el método Walkley y Black (1934).

Muestra	M.O. (%)*	Muestra	M.O. (%)*
14/24-1	4,71	15/4-B2	0,90
14/24-2	5,52	15/4-C1	2,96
14/24-3	3,77	15/4-C2	4,75
14/24-4	5,58	14/17-A2	3,35
14/24-5	4,12	14/17-B2	3,20
14/24-6	2,11	14/17-C2	0,51
14/24-7	3,25	14/17-D2	1,56
14/17-A	0,54	14/28-A	3,66
14/17-B	0,90	14/28-B	2,51
14/17-C	0,83	14/28-D	3,28
14/17-D	0,35	14/28-E	3,17
14/28-1	4,20	14/28-F	4,00
14/28-2	4,30	15/12-A	1,08
14/28-3	4,17	15/12-B	0,71
14/28-4	3,80	15/12-C	2,10
14/28-5	5,10	15/12-D	0,48
14/28-6	3,10	15/12-E	1,44
14/28-7	4,46	15/12-F	0,82
14/28-8	5,33	15/12-G	1,21
15/4-A1	3,21	15/12-H	0,84
15/4-A2	1,12	15/12-I	0,80
15/4-B1	4,77	15/12-J	0,95

(\*). Los porcentajes en materia orgánica (M.O. (%)) han sido obtenidos mediante la determinación del carbono fácilmente oxidable (CFO), utilizando el factor de corrección (63-86 (%)) para obtener el carbono orgánico total (COT) y finalmente utilizando el factor de corrección (1,32) para obtener el porcentaje en materia orgánica de las muestras.

### 2.- Géneros fúngicos presentes en los suelos

Tras haber obtenido los resultados en bruto de todos los porcentajes en materia orgánica de cada una de las muestras estudiadas se procedió a la determinación de la comunidad fúngica total de cada una de las 44 muestras estudiadas. Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla 10**.

**Tabla 10:** Microbiota fúngica identificada en las muestras de suelo recogidas (Tello *et al.*, 1990). Los valores (media  $\pm$  desviación típica) se muestran en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco (UFC/g suelo seco). (\*)  $10^{-3}$  UFC/g $^{-1}$ .

Genero/Especie	Muestreo 1 - $10^4$ UFC/g $^{-1}$										
	14/24-1	14/24-2	14/24-3	14/24-4*	14/24-5	14/24-6	14/24-7	14/17-A	14/17-B*	14/17-C	14/17-D
<i>Acremonium</i> sp.	6,5 $\pm$ 3,3	1,3 $\pm$ 1,2	0,2 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,8	0,2 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 1,1	4,0 $\pm$ 2,5	0,1 $\pm$ 0,3		1,1 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 1,3
<i>Alternaria</i> sp.	0,5 $\pm$ 0,8										
<i>Ambyosporum</i> sp.				0,4 $\pm$ 1,3							
<i>Aspergillus</i> sp.	2,7 $\pm$ 2,2	1,5 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 1,2	0,2 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 1,1	0,1 $\pm$ 0,3		0,1 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,5
<i>Botryosporum</i> sp.											
<i>Botryotrichum</i> sp.				8,7 $\pm$ 3,5							
<i>Botrytis</i> sp.											
<i>Chaetomium</i> sp.	1,1 $\pm$ 1,1	0,2 $\pm$ 0,4		0,9 $\pm$ 1,4		2,3 $\pm$ 0,9					
<i>Cladosporium</i> sp.	0,6 $\pm$ 0,8		0,7 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,7							0,9 $\pm$ 0,7
<i>Drechlera</i> sp.				0,4 $\pm$ 0,8							
<i>F. dimerum</i>											
<i>F. equiseti</i>		2,6 $\pm$ 1,1	3,9 $\pm$ 1,8		0,7 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,8				
<i>F. oxysporum</i>					0,1 $\pm$ 0,3		0,9 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 2,3	0,9 $\pm$ 1,3		0,2 $\pm$ 0,4
<i>F. proliferatum</i>											
<i>F. solani</i>	4,0 $\pm$ 2,3	1,1 $\pm$ 1,3	1,1 $\pm$ 1,1		1,0 $\pm$ 0,8	0,2 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 1,0		0,8 $\pm$ 0,8		
<i>F. roseum</i>	1,5 $\pm$ 2,2			0,5 $\pm$ 0,7							
<i>Geotrichum</i> sp.		0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3								
<i>Gilmanella</i> sp.		4,0 $\pm$ 2,2	4,1 $\pm$ 3,3			0,8 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 0,5				
<i>Hirsutella</i> sp.											
<i>Humicola</i> sp.											
<i>Mucor</i> sp.		0,7 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 1,6	0,2 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 1,4	1,5 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,9				
<i>Ostrachoderma</i>											
<i>Paecylomices</i> sp.											
<i>Penicillium</i> sp.	0,1 $\pm$ 0,3	10,2 $\pm$ 4,9	2,3 $\pm$ 1,6			0,1 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 1,4	1,4 $\pm$ 1,1			
<i>Pythium</i> sp.										1 $\pm$ 0,8	
<i>Phoma</i> sp.											
<i>Rhizoctonia bataticola</i>	0,3 $\pm$ 0,5										
<i>Rhizopus</i> sp.											
<i>Stachybotrys</i> sp.	0,1 $\pm$ 0,3										
<i>Staphylotrichum</i> sp.		0,3 $\pm$ 0,5		0,1 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 2,5	0,1 $\pm$ 0,3					
<i>Stemphylium</i> sp.	8,5 $\pm$ 4,4	9,6 $\pm$ 2,5	17,2 $\pm$ 5,2	2 $\pm$ 1,2	9 $\pm$ 4,1	2,7 $\pm$ 1,2	7,1 $\pm$ 2,6				
<i>Trichoderma</i> sp.			0,1 $\pm$ 0,3			0,1 $\pm$ 0,3					
<i>Verticillium</i> sp.				0,7 $\pm$ 0,7							
No Identificado	1,7 $\pm$ 1,9			1,4 $\pm$ 1,2		0,3 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 1,2	0,7 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,9	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3
<b>Total</b>	<b>27,6<math>\pm</math>13,0</b>	<b>31,6<math>\pm</math>7,5</b>	<b>32,7<math>\pm</math>6,6</b>	<b>17,0<math>\pm</math>3,8</b>	<b>17,1<math>\pm</math>5,5</b>	<b>9,2<math>\pm</math>2,1</b>	<b>18,6<math>\pm</math>4,3</b>	<b>7,9<math>\pm</math>2,9</b>	<b>2,6<math>\pm</math>1,7</b>	<b>2,3<math>\pm</math>1,5</b>	<b>2,8<math>\pm</math>1,4</b>



Tabla 10: (continuación)

Genero/Especie	Muestreo 1 - 10 <sup>4</sup> UFG/g <sup>-1</sup>											
	14/28-1	14/28-2	14/28-3	14/28-4	14/28-5	14/28-6	14/28-7	14/28-8	15/4-A1*	15/4-A2	15/4-B1	15/4-B2*
<i>Acremonium</i> sp.	4,1±1,9	2,8±2,0	5,7±3,7	3,7±2,4	3,7±2,0	6,8±3,7	2,9±1,8	3,7±2,4	1,6±0,7	0,4±0,7	0,1±0,3	
<i>Alternaria</i> sp.		0,5±0,5	0,3±0,5	0,5±0,8	0,4±0,5	1,4±1,1	0,4±0,7	2,6±1,6				
<i>Ambyosporum</i> sp.							1,4±2,4					
<i>Aspergillus</i> sp.		0,7±0,9	1,0±1,2	0,3±0,5	1,6±1,6	2,6±1,6	1,4±1,2	0,9±1,4	93,8±11,6	0,1±0,3	7,2±3,2	
<i>Botryosporum</i> sp.	0,2±0,6				0,1±0,3							
<i>Botryotrichum</i> sp.			0,7±1,5	0,7±0,8		0,1±0,3						
<i>Botrytis</i> sp.												
<i>Chaetomium</i> sp.												
<i>Cladosporium</i> sp.	0,2±0,4	0,2±0,4	0,2±0,4	0,1±0,3					0,2±0,4			1,8±1,0
<i>Drechlera</i> sp.	2,1±1,1	1,2±0,9	1,9±0,9			0,1±0,3	0,2±0,6					
<i>F. dimerum</i>							0,8±0,8	0,4±0,7				
<i>F. equiseti</i>				3,8±2,5	3,1±1,4	3,0±1,3	1,3±0,7	1,9±1,1				
<i>F. oxysporum</i>	0,2±0,6	0,2±0,4	0,1±0,3	0,1±0,3	0,4±0,8			0,2±0,4	7±3,0			
<i>F. proliferatum</i>												
<i>F. solani</i>	0,3±0,5	0,1±0,3	0,6±0,7	0,3±0,7	0,6±0,8	0,5±0,5	0,6±0,7	0,6±0,8				
<i>F. roseum</i>												
<i>Geotrichum</i> sp.					0,1±0,3							
<i>Gilmanella</i> sp.		0,1±0,3	1,0±1,5	1,2±1,3	0,2±0,6	0,2±0,6	0,1±0,3					
<i>Hirsutella</i> sp.		0,1±0,3	0,5±0,7									
<i>Humicola</i> sp.	3,1±1,1	1,3±1,6	2,7±2,3	4,2±2,4	1,4±1,5	1,6±1,6		0,7±1,3				
<i>Mucor</i> sp.	0,3±0,5	0,7±0,8	0,2±0,4		4,5±2,2	1,9±1,2	0,3±0,5	0,2±0,4				
<i>Ostrachoderma</i> sp.									10,8±3,5			
<i>Paecylomices</i> sp.						0,1±0,3	1,7±1,6	1,7±2,2				
<i>Penicillium</i> sp.	1,4±1,3	1,4±1,7	1,3±1,6	0,7±0,8		1,0±1,1	1,9±1,4	1,7±1,1	0,6±1,0	0,1±0,3		2,5±1,7
<i>Pythium</i> sp.												
<i>Phoma</i> sp.				0,5±0,7		0,1±0,3		0,9±0,6				
<i>Rhizoctonia bataticola</i>	1,5±1,1				0,1±0,3							
<i>Rhizopus</i> sp.												
<i>Stachybotrys</i> sp.		0,1±0,3			0,1±0,3	1,7±1,4	0,3±0,7					
<i>Staphylotrichum</i> sp.	0,5±0,8	0,2±0,4	0,5±0,7	0,5±0,7	0,7±0,9	0,7±1,5		1,1±1,2				
<i>Stemphylium</i> sp.	2,3±1,7	2,3±1,6	2,8±1,9	3,6±2,3	1,3±1,1	2,3±0,7	1,9±1,7	4±1,6				
<i>Trichoderma</i> sp.	0,1±0,3		0,4±0,7	0,6±0,5								
<i>Verticillium</i> sp.		1,2±1,2				0,6±0,8						
No identificado	1,2±1,0	0,6±0,8	1,1±1,3	0,7±1,2	1,6±1,1	1±1,2	1,7±1,2	1±0,8	0,4±0,5		3,6±2,1	6,4±2,5
<b>Total</b>	<b>17,8±2,4</b>	<b>13,7±3,6</b>	<b>21,0±6,0</b>	<b>21,5±3,7</b>	<b>19,9±4,3</b>	<b>25,7±4,7</b>	<b>16,9±5,0</b>	<b>21,6±4,5</b>	<b>114,9±10,3</b>	<b>0,7±0,9</b>	<b>10,9±3,1</b>	<b>10,7±3,4</b>

Tabla 10: (continuación)

Genero/Especie	Muestreo 1 – 10 <sup>4</sup> UFG/g <sup>-1</sup>									
	15/4-C1	15/4-C2	14/17-A2	14/17-B2*	14/17-C2*	14/17-D2*	14/28-A	14/28-B	14/28-D	14/28-E
<i>Acremonium</i> sp.	0,1±0,3			1,5±1,4		0,2±0,4	6,3±1,3	4,4±4,1	18,4±5,7	12,1±4,9
<i>Alternaria</i> sp.				0,1±0,3			1,6±1,2		0,4±0,8	1,9±2,0
<i>Ambyosporum</i> sp.										
<i>Aspergillus</i> sp.	0,3±0,9	5±2,9	148,0±12,3	3,2±0,9	4,3±2,3	0,7±0,9	0,5±0,7	0,4±0,7	1,0±0,8	0,8±1,0
<i>Botryosporum</i> sp.										
<i>Botryotrichum</i> sp.										
<i>Botrytis</i> sp.										
<i>Chaetomium</i> sp.										
<i>Cladosporium</i> sp.				6,8±4,0	0,1±0,3		11,4±6,8	0,9±0,7	20,0±6,5	3,3±1,9
<i>Drechlera</i> sp.										
<i>F.dimerum</i>										
<i>F. equiseti</i>							0,6±0,5	1,0±0,8	2,0±1,6	0,4±0,7
<i>F. oxysporum</i>	2,1±1,9				0,1±0,3		0,2±0,4		0,2±0,4	0,4±0,5
<i>F. proliferatum</i>	0,4±0,5									
<i>F. solani</i>	2,0±1,1						0,1±0,3	0,3±0,5	0,5±0,5	0,7±0,8
<i>F. roseum</i>							0,1±0,3		1,1±1,1	0,2±0,4
<i>Geotrichum</i> sp.							0,3±0,7	0,1±0,3	0,1±0,3	0,6±0,7
<i>Gilmanella</i> sp	0,1±0,3									
<i>Hirsutella</i> sp.										
<i>Humicola</i> sp.							0,1±0,3	0,2±0,4	0,8±1,1	
<i>Mucor</i> sp.								0,1±0,3		
<i>Ostrachoderma</i> sp										
<i>Paecylomices</i> sp.										
<i>Penicillium</i> sp.		3,8±4,2		3,2±1,9			1,6±1,2	0,5±0,7	1,4±1,4	1,2±1,3
<i>Pythium</i> sp.										
<i>Phoma</i> sp.							0,5±1,0	0,1±0,3	0,4±0,5	0,6±0,7
<i>Rhizoctonia bataticola</i>										
<i>Rhizopus</i> sp.										0,4±0,7
<i>Stachybotrys</i> sp.							0,5±0,7	0,1±0,3		0,1±0,3
<i>Staphylotrichum</i> sp.								0,1±0,3	0,4±0,7	1,2±2,3
<i>Stemphylium</i> sp.							2,0±1,0	1,6±1,6	4,1±2,6	3,6±2,2
<i>Trichoderma</i> sp.		1,7±1,3					0,2±0,4	0,2±0,4	1,1±0,9	0,1±0,3
<i>Verticillium</i> sp.								0,2±0,6	0,1±0,3	0,2±0,6
No Identificado							0,9±0,7	1,4±1,3	0,6±1,0	1,4±1,1
<b>Total</b>	<b>5,0±2,1</b>	<b>10,5±4,7</b>	<b>148,0±2,3</b>	<b>14,8±5,1</b>	<b>4,5±2,4</b>	<b>0,9±2,1</b>	<b>28,1±6,4</b>	<b>11,7±4,7</b>	<b>52,9±11,6</b>	<b>29,4±6,4</b>

Tabla 10: (continuación)

Genero/Especie	Muestreo 1 – 10 <sup>4</sup> UFG/g <sup>-1</sup>										
	14/28-F	15/12-A*	15/12-B*	15/12-C	15/12-D*	15/12-E*	15/12-F	15/12-G*	15/12-H	15/12-I*	15/12-J
<i>Acremonium</i> sp.	7,3±3,1	2,1±1,3	1,3±1,1	0,2±0,4	0,1±0,3	0,7±0,8	0,1±0,3	0,1±0,3	1,2±1,0	0,1±0,3	0,2±0,4
<i>Alternaria</i> sp.	0,7±0,9				4,8±2,5	0,3±0,5			0,2±0,4		0,6±0,7
<i>Ambyosporum</i> sp.											
<i>Aspergillus</i> sp.	2,2±1,3			26,0±5,4	1,1±1,1	5,3±2,0	1,3±1,3	0,7±0,5	9,1±3,5	0,7±0,7	
<i>Botryosporium</i> sp.											
<i>Botryotrichum</i> sp.											
<i>Botrytis</i> sp.					0,3±0,7						
<i>Chaetomium</i> sp.	0,1±0,3			9,3±4,5	1,7±1,3	3,1±2,0	1,4±1,3	2,7±1,7			
<i>Cladosporium</i> sp.	73,7±12,3	0,2±0,4	0,6±0,7		12,1±5,6	16,6±9,4	0,3±0,5	0,7±1,1	8,0±2,2	1,3±1,3	12,9±3,4
<i>Drechlera</i> sp.											
<i>F.dimerum</i>											
<i>F. equiseti</i>	0,9±0,7										
<i>F. oxysporum</i>	0,2±0,4					1,2±1,0					
<i>F. proliferatum</i>											
<i>F. solani</i>	0,2±0,4					3,4±1,8	0,4±0,7	0,9±1,0	0,8±0,6	0,4±0,7	
<i>F. roseum</i>	0,4±1,0										
<i>Geotrichum</i> sp.											
<i>Gilmanella</i> sp.						4,1±2,0		0,1±0,3			
<i>Hirsutella</i> sp.											
<i>Humicola</i> sp.					0,9±0,6		0,3±0,5	0,3±0,5			
<i>Mucor</i> sp.		0,2±0,4		1,2±0,9	0,1±0,3						
<i>Ostrachoderma</i> sp.											
<i>Paecylomices</i> sp.								0,2±0,6			
<i>Penicillium</i> sp.	1,1±1,0				0,1±0,3					0,3±0,5	0,2±0,4
<i>Pythium</i> sp.											
<i>Phoma</i> sp.						0,1±0,3					
<i>Rhizoctonia bataticola</i>											
<i>Rhizopus</i> sp.	0,5±0,7										
<i>Stachybotrys</i> sp.											
<i>Staphylotrichum</i> sp.											
<i>Stemphylium</i> sp.	1,0±1,6										
<i>Trichoderma</i> sp.										1,6±1,1	
<i>Verticillium</i> sp.										0,2±0,4	
No Identificado	0,8±1,0	0,4±0,5			5,2±3,5	1,7±1,6		5,8±2,3			
<b>Total</b>	<b>89,2±10,9</b>	<b>2,9±1,3</b>	<b>1,9±1,2</b>	<b>36,7±7,4</b>	<b>26,4±6,1</b>	<b>37,1±8,7</b>	<b>3,8±2,1</b>	<b>11,5±3,3</b>	<b>19,3±5,5</b>	<b>5,0±1,3</b>	<b>13,9±3,2</b>

### 3.- Índices de diversidad de los suelos

Con los datos expuestos en la **Tabla 10** se calcularon posteriormente los diferentes índices de diversidad, previamente descritos en el punto 3.4 de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11:** Valores del cálculo de los índices de diversidad de Margalef (d), Pielou (J'), Shannon-Weinner (H') y Simpson (1-Lambda), así como el número total de géneros (S) y el número total de individuos (N).

Muestra	S	N	d	J'	H'(loge)	H'(log2)	H'(log10)	1-Lambda'
14/24-1	11	276000	0,7982	0,7498	1,7980	2,5940	0,7809	0,7941
14/24-2	10	316000	0,7107	0,7359	1,6950	2,4450	0,7359	0,7692
14/24-3	10	327000	0,7088	0,6523	1,5020	2,1670	0,6523	0,6744
14/24-4	13	17400	1,2290	0,6994	1,7940	2,5880	0,7791	0,7170
14/24-5	6	170000	0,4152	0,7651	1,3710	1,9780	0,5954	0,6642
14/24-6	11	92000	0,8749	0,7931	1,9020	2,7440	0,8259	0,8088
14/24-7	8	186000	0,5769	0,8318	1,7300	2,4950	0,7512	0,7736
14/17-A	5	65000	0,3609	0,6097	0,9813	1,4160	0,4262	0,5240
14/17-B	2	2600	0,1272	0,9306	0,6450	0,9306	0,2801	0,4528
14/17-C	4	23000	0,2987	0,7124	0,9876	1,4250	0,4289	0,5785
14/17-D	5	28000	0,3906	0,7878	1,2680	1,8290	0,5506	0,6633
14/28-1	13	196000	0,9847	0,8624	2,2120	3,1910	0,9606	0,8726
14/28-2	16	149000	1,2590	0,8734	2,4220	3,4940	1,0520	0,8937
14/28-3	16	229000	1,2150	0,8565	2,3750	3,4260	1,0310	0,8776
14/28-4	14	215000	1,0590	0,8270	2,1830	3,1490	0,9479	0,8571
14/28-5	14	199000	1,0650	0,7933	2,0940	3,0210	0,9093	0,8479
14/28-6	17	258000	1,2840	0,8245	2,3360	3,3700	1,0140	0,8720
14/28-7	13	171000	0,9959	0,8853	2,2710	3,2760	0,9861	0,8833
14/28-8	12	216000	0,8955	0,9100	2,2610	3,2620	0,9821	0,8795
15/4-A1	6	114200	0,4293	0,3700	0,6630	0,9565	0,2879	0,3124
15/4-A2	4	8000	0,3338	0,8750	1,2130	1,7500	0,5268	0,6563
15/4-B1	3	109000	0,1724	0,6216	0,6828	0,9851	0,2966	0,4545

**Tabla 11** (continuación)

Muestra	S	N	d	J'	H'(loge)	H'(log2)	H'(log10)	1-Lambda'
15/4-B2	3	10700	0,2156	0,8620	0,9470	1,3660	0,4113	0,5594
15/4-C1	4	50000	0,2773	0,3030	0,4201	0,6061	0,1825	0,1856
15/4-C2	3	105000	0,1730	0,9247	1,0160	1,4660	0,4412	0,6161
14/17-A2	3	1800000	0,1389	0,2778	0,3052	0,4403	0,1325	0,1449
14/17-B2	5	14800	0,4166	0,7986	1,2850	1,8540	0,5582	0,6851
14/17-C2	3	4500	0,2378	0,1935	0,2126	0,3068	9,23E-02	8,60E-02
14/17-D2	2	900	0,1470	0,7642	0,5297	0,7642	0,2300	0,3461
14/28-A	13	269000	0,9598	0,7011	1,7980	2,5950	0,7810	0,7492
14/28-B	15	116000	1,2010	0,7409	2,0060	2,8950	0,8713	0,7997
14/28-D	14	526000	0,9869	0,6163	1,6260	2,3460	0,7063	0,7197
14/28-E	15	292000	1,112	0,7425	2,0110	2,9010	0,8733	0,7852
14/28-F	10	891000	0,6569	0,3260	0,7506	1,0830	0,3260	0,3077
15/12-A	4	2900	0,3763	0,6318	0,8758	1,2640	0,3804	0,4472
15/12-B	2	1900	0,1325	0,8997	0,6237	0,8997	0,2708	0,4324
15/12-C	4	367000	0,2341	0,5282	0,7323	1,0560	0,3180	0,4328
15/12-D	10	26400	0,8840	0,6627	1,5260	2,2020	0,6627	0,7109
15/12-E	9	36500	0,7615	0,7413	1,6290	2,3500	0,7074	0,7338
15/12-F	6	38000	0,4741	0,8195	1,4680	2,1180	0,6377	0,7230
15/12-G	9	11500	0,8556	0,6707	1,4740	2,1260	0,6400	0,6759
15/12-H	5	193000	0,3287	0,6658	1,0720	1,5460	0,4654	0,6002
15/12-I	7	4600	0,7114	0,8330	1,6210	2,3390	0,7040	0,7620
15/12-J	4	139000	0,2533	0,2359	0,3270	0,4718	0,1420	0,1364

#### 4.- Análisis de los resultados

##### 4.1.- Análisis univariantes y bivariantes clásicos con los distintos parámetros e índices clásicos.

**4.1.1.- Correlaciones de Pearson:** en primer lugar se determinaron las correlaciones lineales de Pearson entre el porcentaje en materia orgánica de las muestras y los índices de diversidad utilizados anteriormente, dando lugar a la **Tabla 12**.

**Tabla 12:** Análisis de las correlaciones de Pearson entre el porcentaje en materia orgánica de los suelos (% M.O.) y el número total de géneros (S), número total de individuos (N), Índice de riqueza de Margalef (d), de equitatividad de Pielou (J), de diversidad de Shannon (H) y de diversidad de Simpson ( $1-\lambda$ ).

	r (% M.O.)	p-valor
<b>N</b>	0,3149	0,040
<b>S</b>	0,5424	0,000
<b>d</b>	0,4776	0,001
<b>J</b>	0,1363	0,400
<b>H</b>	0,4796	0,001
<b>1-<math>\lambda</math></b>	0,3799	0,010

El rango de estos coeficientes de correlación (r) va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables, siguiendo ambas una correlación lineal, negativo o positiva. Para el valor de 0, o cercano a cero, se traduce en una ausencia total de correlación lineal. Los p-valor  $\leq 0.05$  presenta diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados recogidos en la **Tabla 12** indican que para el número total de individuos (N), existe una correlación con el porcentaje en materia orgánica del suelo más baja que el resto, así como en el índice de equitatividad de Pielou con un  $r = 0.1$ , siendo este valor estadísticamente no significativo (p-valor  $> 0.05$ ). De esta forma puede deducirse, únicamente para el caso de N, estadísticamente significativo, que al aumentar el porcentaje en materia orgánica de un suelo no se produce un aumento en el número total de individuos fúngicos de forma lineal, si no que en cada caso presenta un comportamiento diferente.

Para el caso del número total de géneros (S), el índice de riqueza de especies (d) y el índice de diversidad de Shannon (H), con un valor de  $r = 0.5$  y p-valor  $\leq 0.05$ , puede establecerse que existe una correlación lineal considerable y estadísticamente significativa. Lo cual indica que conforme aumenta el porcentaje en materia orgánica de un suelo se va a ver aumentado el número total de géneros fúngicos, así como la riqueza de especies y la diversidad.

**4.1.2.- Análisis ANOVA/t-Student:** se analizaron los parámetros correspondientes a los índices de biodiversidad en función de los factores tenidos en cuenta, dando lugar a los resultados expresados en la **Tabla 13**.

**Tabla 13:** Parámetros relacionados con la diversidad fúngica de los suelos estudiados en función de los factores zona, % de materia orgánica y tipo de cultivo en factores de la microbiota fúngica del suelo, (N (total de individuos), S (Total de géneros), d (Riqueza de Margalef), J (Equitatividad de Pielou), H (diversidad de Shannon) y  $1-\lambda$  (Diversidad de Simpson)).

		N	S	d	J	H	$1-\lambda$
Zona	Zújar	197771,0 ± 116497,0a	10,0 ± 2,3 b	0,8 ± 0,3 b	0,7 ± 0,1a	1,7 ± 0,2a	0,7 ± 0,1 a
	Fornes	286692,0 ± 207059,0a	14,0 ± 2,0 a	1,0 ± 0,2 a	0,8 ± 0,1a	2,0 ± 2,4a	0,8 ± 0,2 a
	Costa	131521,0 ± 364999,0a	5,0 ± 2,2 c	0,4 ± 0,2 c	0,7 ± 0,2a	0,9 ± 0,4b	0,5 ± 0,2 b
	<i>p-valor</i>	<b>0,30</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,20</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
G. % M.O.	1 (0-1,5)	37225,0 ± 54025,0b	5,1 ± 3,0b	0,4 ± 0,3 b	0,7 ± 0,2a	1,0 ± 0,4a	0,6 ± 0,2a
	2 (1,5-3)	12518,0 ± 14209,1ab	7,0 ± 6,0ab	0,6 ± 0,5 ab	0,6 ± 0,2a	1,1 ± 0,8ab	0,5 ± 0,3a
	3 (3-4,5)	375800,0 ± 443954,0a	11,0 ± 5,0a	0,8 ± 0,4 a	0,7 ± 0,2a	2,0 ± 0,7a	0,7 ± 0,2a
	4 (>4,5)	176175,0 ± 97422,3ab	10,0 ± 4,4a	0,8 ± 0,4 a	0,8 ± 0,1a	2 ± 0,6 a	0,7 ± 0,1a
	<i>p-valor</i>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>0,49</b>	<b>0,02</b>	<b>0,09</b>
Cultivo	Tomate	255570,0 ± 182365,0a	13,0 ± 2,8a	1,0 ± 0,2a	0,8 ± 0,1a	1,9 ± 0,4a	0,8 ± 0,1a
	Pepino	131521,0 ± 364999,0a	5,0 ± 2,0a	0,4 ± 0,2a	0,7 ± 0,2a	0,9 ± 0,4a	0,5 ± 0,2a
	<i>p-valor</i>	<b>0,17</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

Los valores se representan como media ± desviación típica. Distintas letras en la misma columna y categoría denotan diferencias estadísticas al 95% de confianza ( $p \leq 0,05$ ) mediante el test de las diferencias honestamente significativas de Tukey (HSD).

Puede observarse como en las tres zonas analizadas existen diferencias asociadas al número total de individuos (N). Entre cada una de las zonas no existen diferencias estadísticamente significativas, presentando un  $p$ -valor = 0.3. La zona que presenta un mayor número de individuos (N) corresponde con Fornes, seguida de Zújar y Costa, respectivamente. En cambio, puede observarse como en el número total de géneros (S), si que existen diferencias entre las zonas, presentando diferencias estadísticamente significativas en el número total de especies. A su vez, puede deducirse que ninguna de las zonas presenta una mayor similitud con otra, las tres presentan diferencias entre ellas, donde la zona Fornes es la que presenta un mayor promedio, por encima de Zújar y Costa, al igual que en N.

Para el caso de la variable %M.O. observamos diferencias estadísticamente significativas en N, con un  $p$ -valor=0.01. Las mayores diferencias podemos encontrarlas entre los grupos 1 y 3. Del mismo modo, encontramos diferencias estadísticamente significativas para el índice S. Estas diferencias están asociadas a los grupos 1 y 2. Las mayores diferencias significativas se encuentran entre los grupos 1-2 y los grupos 3-4.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 3 y 4. A su vez, puede observarse como los grupos 3 y 4 presentan un promedio mucho mayor, en torno al doble, del número total de especies, respecto a los grupos 1 y 2. Lo cual nos indica que cuanto mayor sea el porcentaje en materia orgánica de un suelo va a existir una tendencia hacia un mayor número de individuos (N), así como un mayor número de géneros (S).

Por último, el tipo de cultivo va a establecer diferencias estadísticamente significativas, únicamente en el número total de géneros (S). Para el número total de individuos (N), con un  $p$ -valor=0.17, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Únicamente se observa una tendencia al alza en el promedio de N para el caso del Tomate. Tal y como se ha dicho antes, en base al tipo de cultivo, presenta diferencias estadísticamente significativas en el número total de géneros (S). Vemos como el Tomate adquiere un promedio de más del doble respecto al Pepino. Determinando así que el tomate ejerce un fomento en el número total de especies, sin olvidar que las muestras de suelo bajo cultivo de tomate presentan unos mayores porcentajes en materia orgánica que lo de Pepino, factor a tener en cuenta.

La comparación en función de los factores en los índices de riqueza de especies (d) y de equitatividad (J) establece los siguientes resultados. Para el factor Zona, vemos como existen diferencias estadísticamente significativas en el índice d, siendo Fornes la zona con una mayor riqueza de especies, seguido de Zújar y Costa. Respecto al índice J, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Con un  $p$ -valor = 0.2, se observan promedios muy similares entre las zonas respecto la proporción de diversidad observada.

El factor %M.O. da lugar a diferencias estadísticamente significativas en la riqueza de especies de Margalef (d), con un  $p$ -valor=0.016. Las diferencias más significativas se dan entre los grupos 1-2 y los 3-4. A su vez, existen diferencias estadísticamente honestas entre los grupos 1 y 2 y así como los grupos 1 y 2 respecto a los 3 y 4, los cuales, estos últimos, no presentan diferencias estadísticamente significativas. En el índice J no se establecen diferencias estadísticamente significativas. El grupo con una mayor proporción de diversidad corresponde con el grupo 4.



Por último, el factor cultivo presenta diferencias estadísticamente significativas en el índice  $d$ . Al igual que en el caso anterior, en los índices  $N$  y  $S$ , observamos que Tomate presenta una mayor riqueza de géneros que Pepino, pudiendo achacarse de nuevo a los altos niveles en materia orgánica que presentan las muestras de Tomate.

Los últimos índices analizados son el índice de diversidad Shannon ( $H$ ) y Simpson ( $1 - \lambda$ ). En primer lugar se observa como las diferentes zonas presentan diferencias estadísticamente significativas en ambos índices. Para el índice  $H$  observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en los grupos Zújar y Fornes respecto a Costa, no habiendo diferencias significativas entre Zújar y Fornes. Al igual que en los casos anteriores, sigue siendo la zona Fornes la de mayor promedio, seguido de Zújar. Para el índice  $1 - \lambda$  ocurre la misma tendencia. No existen diferencias significativas entre Fornes y Zújar, pero si ambas respecto a Costa. Los promedios coinciden en orden con el índice  $H$ .

La variable %M.O. presenta diferencias significativas en el índice  $H$ . No se encuentran diferencias significativas entre los grupos 1 y 2, así como entre los grupo 3 y 4. Únicamente se dan entre los grupos 1 y 2 respecto a los 3 y 4. Donde 3 y 4 obtienen los promedios más elevados. Para el caso del índice  $1 - \lambda$ , no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Se deducen unos promedios más elevados en los grupos 3 y 4 respecto a 1 y 2, sin ser estadísticamente significativos.

Por último, el factor cultivo, que es la que presenta unas mayores diferencias significativas en todos los índices analizados, vemos como, de nuevo, da lugar a diferencias estadísticamente significativas en ambos índices. Para el caso del índice  $H$ , vemos como Tomate presenta un mayor promedio, respecto a Pepino, de más del doble. Encontramos el mismo comportamiento en el índice  $1 - \lambda$ . Existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos cultivos, donde Tomate presenta un mayor promedio. Esta tendencia no indica que el cultivo de Tomate ejerza un mayor papel en el aumento de la diversidad fúngica del suelo, ya que ello está sujeto a un mayor número de factores, donde el porcentaje en materia orgánica presenta uno de los papeles más determinantes.

#### **4.2.- Análisis multivariantes que consideran tantas variantes como géneros fúngicos identificados en los suelos analizados.**

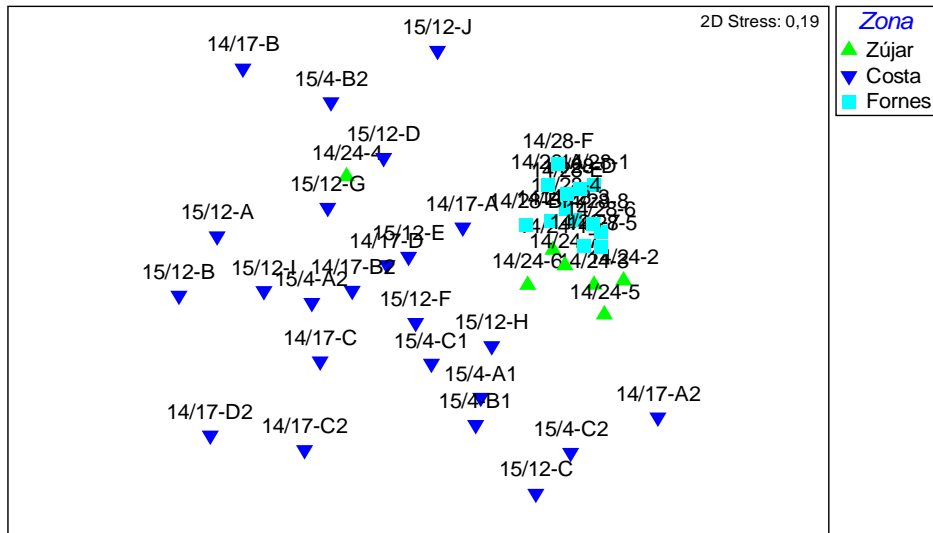
Tras obtener los datos en bruto de los porcentajes en materia orgánica, así como de los valores correspondientes a cada muestra de suelo de los índices de biodiversidad se procedió a su estudio mediante análisis basados en correlaciones entre diferentes factores, análisis ANOVA Y SIMPER. Cada uno de estos análisis se estableció en base a tres factores principales, los cuales corresponden con la Zona (Fornes, Zújar y Costa), el porcentaje en materia orgánica (M.O. (%)) y el tipo de cultivo presente en el suelo (Tomate o Pepino).

En primer lugar se analizaron los diferentes factores o categorías considerados (Zona, Cultivo y %M.O.) con los datos de los índices de biodiversidad utilizados anteriormente (**Tabla 11**) (N (total de individuos), S (total de géneros), d (Riqueza de especies), J (equitatividad), H (diversidad de Shannon) y  $1-\lambda$  (diversidad de Simpson), mediante análisis Anova.

##### **4.2.1.- Zona de procedencia**

###### **1.- n-MDS**

En primer lugar se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS), para así determinar si existían diferencias entre las zonas muestreadas, en base a la comunidad fúngica presente en cada muestra, así como en los índices de diversidad, de esta forma se obtuvo la siguiente imagen:



**Figura 22:** Análisis n-MDS en función de la categoría zona de procedencia.

En la **Figura 22** se observa una mayor homogeneidad en la distribución espacial de Zújar y en especial, la zona Fornes, con una distribución muy concentrada en una pequeña parte de la imagen. Para el caso de la zona Costa, se puede observar una gran dispersión espacial, lo que nos indica que no presenta un patrón determinado y sus muestras presentan una elevada divergencia. Esta divergencia podría estar asociada a que los muestreos realizados en esta zona fueron realizados en diferentes épocas del año, donde tras realizar el primer muestreo, se realizaron tratamientos de biodesinfección, realizando así aportes de materia orgánica, lo que podría haber alterado la biota fúngica presente en los suelos, dando lugar a divergencias en las muestras.

## 2.- ANOSIM

El análisis ANOSIM nos muestra diferencias estadísticamente significativas entre las zonas de procedencia de la muestras en función de la microbiota fúngica que estas contienen (**Tabla 14**).

**Tabla 14:** Análisis ANOSIM entre las diferentes zonas constituyentes del factor Zona con un p-valor global del 0.1% obtenido mediante 999 permutaciones y un valor global de R= 0.24.

Grupos	p-valor (%)	R
Zújar - Costa	6,0	0,168
Zújar - Fornes	0,1	0,591
Costa - Fornes	0,2	0,340

(\*) Los valores del p-valor se expresan en % por lo que p-valor  $\leq 5$  será estadísticamente significativo. A su vez, el valor R presenta unos valores entre -1.0 y +1.0, habiendo diferencias en la composición de la comunidad fúngica entre grupos con valores de R>0 y sin diferencias cuando R=0.

Los resultados de la tabla expresan unas diferencias estadísticamente significativas entre cada una de las comparaciones de los grupos, excepto entre las zonas Zújar-Costa, donde las muestras de ambos grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas (p-valor = 6%) al 95% de confianza.

A su vez, al presentar un valor global de R=0.24, cercano a cero pero mayor que cero, nos indica que existen diferencias entre los grupos que constituyen Zona pero de forma escasa. Los valores R referentes a la comparación entre los grupos, indican que Zújar-Costa (R=0.168) presentan una escasa disimilitud en la comunidad fúngica del suelo, en cambio la comparación entre Zújar-Fornes (R=0.591) nos indica que estos grupos presentan divergencias en cuanto a la composición de la comunidad fúngica se refiere. Por último, la comparación entre Costa-Fornes (R=0.34), indica también la existencia de diferencias en la comunidad fúngica.

### 3.- SIMPER

El siguiente análisis realizado en base al factor Zona fue el SIMPER. De esta forma se pudo determinar la contribución de cada una de las especies fúngicas a la similitud dentro de cada grupo así como a la disimilitud entre los diferentes grupos.

**Tabla 15:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Zújar, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo Zújar		
Similitud promedio: 49,80		
Géneros	Abundancia Promedio	Contribución (%)
<i>Stemphylium sp.</i>	255,94	32,37
<i>Fusarium sp.</i>	148,61	17,44
<i>Aspergillus sp.</i>	107,22	13,21
<i>Acremonium sp.</i>	109,11	10,78
<i>Mucor sp.</i>	78,17	9,08
<i>Penicillium sp.</i>	92,61	4,44
<i>Gilmanella sp.</i>	78,10	4,14

En la **Tabla 15** se muestra como el género *Stemphylium sp.* es el que más contribuye a la similitud de las muestras procedentes de Zújar, con un 32.37%, pudiendo observar que coincide con el género más abundante en las muestras. El segundo género que más contribuye a la similitud entre muestras es *Fusarium sp.* con un 17.44% seguido de *Aspergillus sp.* con un 13.21%.

**Tabla 16:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Fornes, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo Fornes		
Similitud promedio: 62,15		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Acremonium sp.</i>	240,34	20,53
<i>Fusarium sp.</i>	158,32	14,13
<i>Stemphylium sp.</i>	155,69	14,08
No Identificado	102,37	9,56
<i>Penicillium sp.</i>	102,50	8,63
<i>Aspergillus sp.</i>	93,16	7,02
<i>Alternaria sp.</i>	77,96	5,00
<i>Humicola sp.</i>	88,74	4,91
<i>Cladosporium sp.</i>	160,43	3,86
<i>Staphylotrichum sp.</i>	56,42	3,49

La **Tabla 16** determina que la zona Fornes presenta la mayor heterogeneidad fúngica, pudiendo contar hasta nueve géneros fúngicos. A su vez, sus muestras son las de mayor similitud, respecto a las demás zonas. El género que más contribuye a la similitud de las muestras procedentes de Fornes es *Acremonium sp.* con un 20,53%,

seguido de *Fusarium sp.* (14,13%) y *Stemphylium sp.* (14,08%). Por último, vemos como *Cladosporium sp.* con una abundancia promedio de 160,43, la mayor tras *Acremonium sp.*, contribuye a la similitud de muestras con un 3,86%, la segunda que menos contribuye. De esta forma se puede observar como la abundancia en las muestras no es tan importante a la hora de estudiar la similitud de muestras de una zona en base a su microbiota.

**Tabla 17:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Costa, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo Costa		
Similitud promedio: 25,03		
Géneros	Abundancia Promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus sp.</i>	146,84	33,28
<i>Acremonium sp.</i>	49,39	22,26
<i>Cladosporium sp.</i>	54,64	17,44
No Identificado	34,07	10,47
<i>Fusarium sp.</i>	36,13	8,96

En la **Tabla 17** vemos como la zona de Costa presenta una similitud entre muestras del 25.03%. Lo más relevante de esta zona es que la suma de los porcentajes de contribución a la similaridad de los géneros sea del 82% con tan solo cuatro géneros. Estos géneros son *Aspergillus sp* (33.28%), *Acremonium sp* (22.26%), *Cladosporium sp* (17.44%) y *Fusarium sp* (8.96%). Contrasta con la zona Fornes, la cual presenta nueve géneros diferentes para establecer el mismo valor en la sumatoria del porcentaje de contribución. Esta falta de diversidad que presenta la zona Costa puede estar asociada a diversos factores. Podría estar asociada a los bajos niveles en materia orgánica obtenidos en los análisis de la zona.

Posteriormente se realizaron comparaciones entre los grupos Zona para determinar la disimilitud en la microbiota fúngica de los grupos, así como las especies que más contribuyen a ello, mediante el mismo análisis SIMPER. De esta forma se obtuvieron los siguientes resultados (**Tablas 18, 19 y 20**):

**Tabla 18:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre las zonas Zújar y Costa en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos Zújar-Costa			
Disimilitud promedio = 78,57			
	Grupo Zújar	Grupo Costa	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Stemphylium sp.</i>	255,94	0,00	21,64
<i>Aspergillus sp.</i>	107,22	146,84	11,42
<i>Fusarium sp.</i>	148,61	36,13	10,71
<i>Acremonium sp.</i>	109,11	49,39	7,36
<i>Penicillium sp.</i>	92,61	22,83	7,22
<i>Mucor sp.</i>	78,17	5,57	6,97
<i>Gilmanella sp.</i>	78,10	4,40	6,10
<i>Chaetomium sp.</i>	47,32	23,84	5,27
<i>Cladosporium sp.</i>	25,49	54,64	5,20
No Identificado	46,08	34,07	4,71
<i>Staphylotrichum sp.</i>	37,24	0,00	3,70

Su porcentaje de disimilitud fue del 78.57%. Los géneros que más aportaron a esta disimilitud son *Stemphylium sp* (21.64%), *Aspergillus sp* (11.42%), *Fusarium sp* (10.71%) y *Acremonium sp* (7.36%). Esta elevada divergencia puede asociarse a la elevada presencia de *Stemphylium sp* (255.94) en la zona de Zújar, respecto a su ausencia en Costa, así como la baja presencia de *Gilmanella sp* y *Mucor sp* en la zona de Costa respecto a Zújar, donde su abundancia es bastante más elevada.

**Tabla 19:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre las zonas Zújar y Fornes en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos Zújar-Fornes			
Disimilitud promedio = 53,58			
	Grupo Zújar	Grupo Fornes	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Cladosporium sp.</i>	25,49	160,43	10,54
<i>Acremonium sp.</i>	109,11	240,34	10,44
<i>Stemphylium sp.</i>	255,94	155,69	9,43
<i>Penicillium sp.</i>	92,61	102,50	6,59
<i>Humicola sp.</i>	0,00	88,74	6,42
<i>Gilmanella sp.</i>	78,10	27,86	5,16
<i>Alternaria sp.</i>	10,10	77,96	5,13
<i>Fusarium sp.</i>	148,61	158,32	5,02
<i>Mucor sp.</i>	78,17	51,10	4,94
No Identificado	46,08	102,37	4,79
<i>Staphylotrichum sp.</i>	37,24	56,42	4,13
<i>Aspergillus sp.</i>	107,22	93,16	3,98
<i>Chaetomium sp.</i>	47,32	2,43	3,39
<i>Drechlera sp.</i>	2,86	36,05	2,70
<i>Phoma sp.</i>	0,00	33,86	2,40
<i>Trichoderma sp.</i>	9,04	30,64	2,11
<i>Stachybotrys sp.</i>	4,52	29,41	2,11
<i>Botryotrichum sp.</i>	13,32	15,30	1,95

En el caso de las zonas Zújar-Fornes, tal y como se observó anteriormente en la imagen, presentan una divergencia del 53.58%. Esta divergencia está asociada, principalmente en las diferencias de abundancia de géneros. Los géneros con mayor contribución son; *Cladosporium sp* (10.54%), *Acremonium sp* (10.44%), *Stemphylium sp* (9.43%) y *Penicillium sp* (6.59%). Destaca la aportación de *Humicola sp* (6.42%), especialmente por su ausencia en la zona Zújar respecto a su considerable presencia en Fornes (88.74). Otro aspecto a destacar, a pesar de su baja contribución a la divergencia, es el género *Phoma sp* (2.40), el cual también está ausente en la zona Zújar.



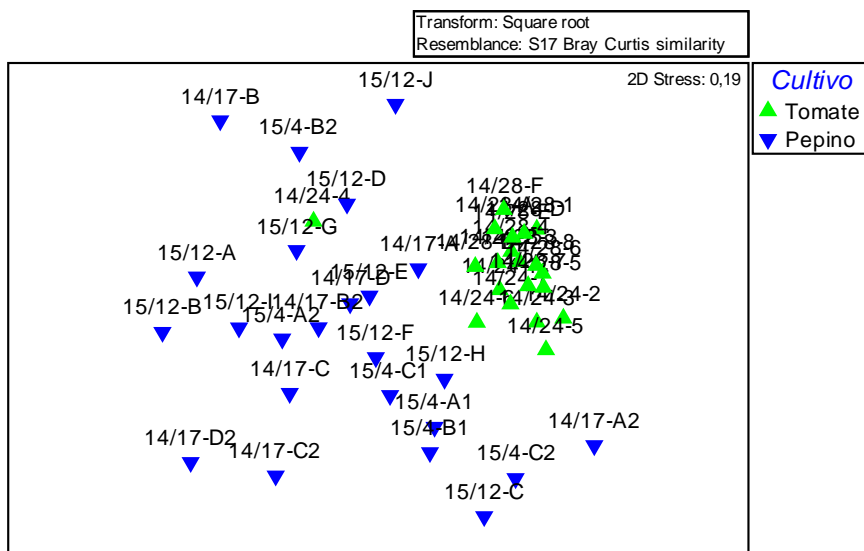
**Tabla 20:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre las zonas Costa y Fornes en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos Costa-Fornes			
Disimilitud promedio = 79,27			
	Grupo Costa	Grupo Fornes	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Acremonium sp.</i>	49,39	240,34	13,09
<i>Stemphylium sp.</i>	0,00	155,69	10,27
<i>Cladosporium sp.</i>	54,64	160,43	9,97
<i>Fusarium sp.</i>	36,13	158,32	8,69
<i>Aspergillus sp.</i>	146,84	93,16	8,01
<i>Penicillium sp.</i>	22,83	102,50	5,96
<i>Humicola sp.</i>	4,25	88,74	5,75
No Identificado	34,07	102,37	5,36
<i>Alternaria sp.</i>	9,12	77,96	4,68
<i>Staphylotrichum sp.</i>	0,00	56,42	3,68
<i>Mucor sp.</i>	5,57	51,10	3,54
<i>Drechlera sp.</i>	0,00	36,05	2,43
<i>Phoma sp.</i>	0,42	33,86	2,19
<i>Trichoderma sp.</i>	7,10	30,64	2,15
<i>Stachybotrys sp.</i>	0,00	29,41	1,97
<i>Gilmanella sp.</i>	4,40	27,86	1,89
<i>Verticillium sp.</i>	0,59	23,70	1,60

Por último, la comparación entre Costa-Fornes, dio lugar a una disimilitud del 79.27%, la mayor de las tres. Algo evidente basándose en la disposición espacial de la figura 23. La mayor contribución a la divergencia es aportada por *Acremonium sp* con un 13.09%, seguido de *Stemphylium sp* (10.27%), *Cladosporium sp* (9.97%), *Fusarium sp* (8.69%) y *Aspergillus sp* (8.01%). Cabe destacar la zona Costa por sus bajos niveles de abundancia en géneros, con ausencia de *Stemphylium sp*, *Staphylotrichum sp*, *Drechlera sp*, lo que hace posible esta enorme divergencia entre las dos zonas.

#### 4.2.2.- Tipo de Cultivo

##### 1.- n-MDS



**Figura 23:** Análisis MDS en base al Cultivo.

En la **Figura 23** puede observarse como el cultivo de Tomate presenta una clara similitud en los géneros de la microbiota fúngica, dada la homogeneidad espacial observada en cada una de las muestras de Tomate. Para el caso del cultivo de Pepino, la ordenación de las muestras presenta una mayor dispersión, dando lugar a una mayor diferenciación entre las muestras de Pepino en base a la microbiota fúngica identificada en cada muestra.

##### 2.- ANOSIM

El siguiente análisis realizado fue el análisis ANOSIM. De esta forma se pretendía determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los dos grupos del factor Cultivo. Al igual que en el análisis ANOSIM del factor Zona se realizaron 999 permutaciones. Los resultados dieron un valor  $R_{GLOBAL}=0.452$ , indicando así que existen diferencias en las comunidades fúngicas de ambos cultivos. El p-valor de dicho análisis era de 0.1% (0.001), por lo tanto las diferencias en la comunidad fúngica entre ambos tipo de cultivo son estadísticamente significativas.

### 3.- SIMPER

Por último, se realizó el análisis SIMPER, para así determinar la similitud (**Tablas 21 y 22**) y disimilitud (**Tabla 23**) entre las muestras de cada tipo de cultivo.

**Tabla 21:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Tipo de cultivo, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo Tomate		
Similitud promedio: 53,26		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Stemphylium sp.</i>	190,78	19,32
<i>Acremonium sp.</i>	194,41	17,71
<i>Fusarium sp.</i>	154,92	16,46
<i>Aspergillus sp.</i>	98,08	9,50
<i>Penicillium sp.</i>	99,04	7,83
No Identificado	82,67	7,78
<i>Mucor sp.</i>	60,57	4,00
<i>Staphylotrichum sp.</i>	49,71	3,10
<i>Alternaria sp.</i>	54,21	2,87
<i>Cladosporium sp.</i>	113,20	2,84

De esta forma puede observarse qué géneros contribuyen a una mayor similitud entre las muestras, determinando que entre todas las muestras de cultivo de Tomate existe una similitud de microbiota fúngica del 53,26 %. Esta similitud se asocia a los géneros *Stemphylium sp*, *Acremonium sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Mucor sp*, *Staphylotrichum sp*, *Alternaria sp* y *Cladosporium sp* ordenados de mayor a menor, en base a su contribución a la similitud. Un aspecto a destacar consiste en que géneros con un mayor promedio de abundancia en las muestras, por ejemplo *Cladosporium sp*, con un 113,2, presentan un menor porcentaje de contribución que géneros como *Mucor sp.*, con una abundancia promedio del 60,57, cuando sus porcentajes de contribución corresponden con un 4% y un 2,8%, respectivamente. Esto indica que la abundancia de un determinado género en los suelos no se traduce en una mayor contribución a la similitud.

**Tabla 22:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de Tipo de cultivo, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo Pepino		
Similitud promedio: 25,03		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus sp.</i>	146,84	33,28
<i>Acremonium sp.</i>	49,39	22,26
<i>Cladosporium sp.</i>	54,64	17,44
No Identificado	34,07	10,47
<i>Fusarium sp.</i>	36,13	8,96

Para las muestras del cultivo de Pepino, tal y como se observa en la tabla, la microbiota fúngica de cada una de las muestras presenta una similitud promedio entre todas ellas del 25,03%. Los géneros que contribuyen a ello son *Aspergillus sp.* (33,28%), *Acremonium sp.* (22,26%), *Cladosporium sp.* (17,44%) y *Fusarium sp.* (8,96%), ordenados por su abundancia en las muestras.

Por último se realizó el análisis SIMPER para determinar la disimilitud entre ambos grupos (Tomate-Pepino), así como que géneros fúngicos eran los mayores contribuidores a esta disimilitud.

**Tabla 23:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los Tipo de cultivo Tomate y Pepino en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

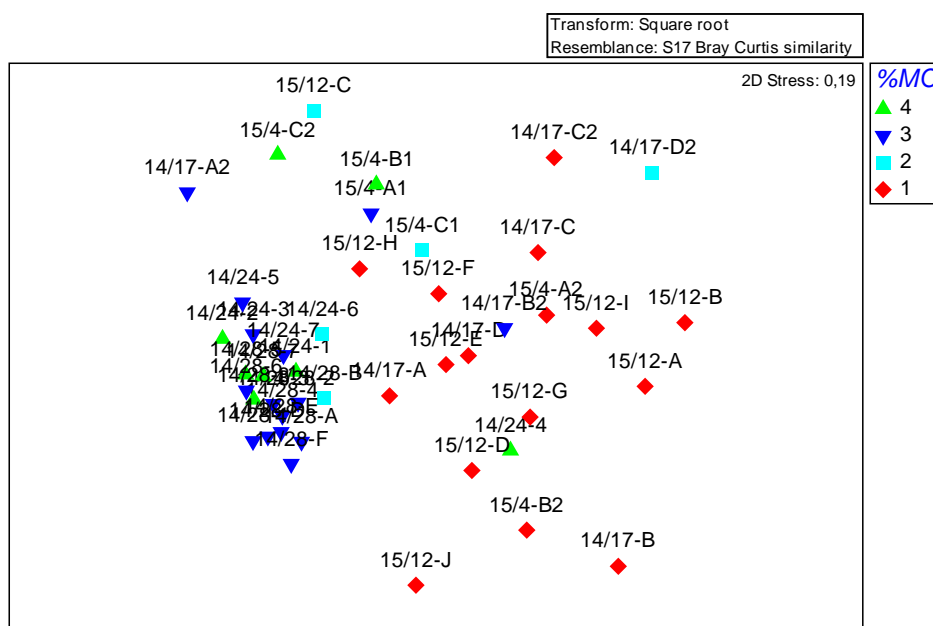
Grupos Tomate-Pepino			
Disimilitud promedio = 79,03			
	Grupo Tomate	Grupo Pepino	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Stemphylium sp.</i>	190,78	0,00	14,23
<i>Acremonium sp.</i>	194,41	49,39	11,09
<i>Fusarium sp.</i>	154,92	36,13	9,39
<i>Aspergillus sp.</i>	98,08	146,84	9,19
<i>Cladosporium sp.</i>	113,20	54,64	8,31
<i>Penicillium sp.</i>	99,04	22,83	6,40
No Identificado	82,67	34,07	5,14
<i>Mucor sp.</i>	60,57	5,57	4,73
<i>Humicola sp.</i>	57,68	4,25	3,89
<i>Staphylotrichum sp.</i>	49,71	0,00	3,69
<i>Alternaria sp.</i>	54,21	9,12	3,51
<i>Gilmanella sp.</i>	45,45	4,40	3,36
<i>Chaetomium sp.</i>	18,14	23,84	2,77
<i>Trichoderma sp.</i>	23,08	7,10	1,86
<i>Drechlera sp.</i>	24,43	0,00	1,77
<i>Botryotrichum sp.</i>	14,61	0,00	1,48

Por último, el porcentaje de disimilitud entre ambos cultivos presenta un 79,03%. Este alto porcentaje de divergencia en los géneros fúngicos de ambos cultivos lo aportan, en gran parte, unos pocos géneros. Estos géneros corresponden con *Stemphylium sp* que contribuye con un 14,23%, *Acremonium sp* con un 11,09%, *Fusarium sp* con un 9,39% y *Aspergillus sp* con un 9,19%. De la misma forma que antes, en la similitud entre las muestras de cultivo de Tomate, se puede apreciar como *Cladosporium sp* con una presencia mayor que *Aspergillus sp* en las muestras, presenta un menor porcentaje de contribución a la disimilitud. Cabe destacar que los géneros que más contribuyen a la disimilitud de muestras corresponden con los géneros de saprófitos más importantes, lo cual podría coincidir con los elevados niveles de materia orgánica asociados al cultivo de Tomate frente a los bajos niveles en Pepino.

### 4.2.3.- Contenido en Porcentaje de materia orgánica.

#### 1.- n-MDS

En primer lugar se expuso al análisis MDS, para así determinar qué situación espacial ocupaba cada una de las muestras estudiadas y poder comprobar la existencia de diferencias entre cada una de las muestras estudiadas. Cabe señalar la organización en cuatro grupos que se realizó para diferenciar los distintos niveles en materia orgánica de cada una de las muestras.



**Figura 24:** Análisis MDS en base al porcentaje en materia orgánica. Los grupos enumerados del 1-4, siendo 1 (0-1.5% M.O.); 2 (1.5-3% M.O.); 3 (3-4.5% M.O.) y 4 (4.5-6% M.O.).

En la **figura 24** puede observarse como la mayoría de las muestras con niveles de materia orgánica altas (3 y 4) presentan una tendencia de similaridad entre la biota presente en las muestras. En cambio, conforme disminuye el porcentaje en materia orgánica de las muestras, estas presentan una mayor dispersión espacial, traducida en una mayor variabilidad en los géneros fúngicos presentes.

#### 2.- ANOSIM

Posteriormente se realizó el análisis ANOSIM (**Tabla 24**), de forma que se determinasen las diferencias estadísticas significativas entre cada uno de los grupos.

**Tabla 24:** Análisis ANOSIM entre los diferentes grupos de porcentaje de materia orgánica un p-valor global del 0.1% obtenido mediante 999 permutaciones y un valor global de R= 0.31.

Grupos	R	p-valor (%)
4, 3	0,072	20,1
4, 2	0,089	20,9
4, 1	0,380	0,1
3, 2	0,341	2,9
3, 1	0,484	0,1
2, 1	0,241	3,7

(\*) Los valores del p-valor se expresan en % por lo que p-valor  $\leq 5$  será estadísticamente significativo. A su vez, el valor R presenta unos valores entre -1.0 y +1.0, habiendo diferencias en la composición de la comunidad fúngica entre grupos con valores de R>0 y sin diferencias cuando R=0.

Tal y como se observa en la tabla, no existen grandes diferencias entre los grupos 4-3 y 4-2, ya que sus valores R están cercanos a 0, lo cual indica que las diferencias entre los géneros de la comunidad fúngica son muy pequeñas. A su vez vemos como los valores p-valor de ambos grupos no son estadísticamente significativos. El resto de las comparaciones (4-1; 3-2; 3-1; 2-1) conforman la existencia de diferencias en las comunidades fúngicas de cada grupo, siendo todos ellos estadísticamente significativos.

### 3.- SIMPER

**Tabla 25:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 4, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo 4		
Similaridad promedio: 36,22		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	141,57	25,83
<i>Acremonium</i> sp.	123,78	14,76
<i>Fusarium</i> sp.	125,72	13,91
<i>Stemphylium</i> sp.	137,25	13,05
No Identificado	89,30	12,18
<i>Penicillium</i> sp.	101,77	8,24
<i>Mucor</i> sp.	51,18	2,86

Al analizar los porcentajes de similitud entre muestras (**Tabla 25**) mediante la identificación de los géneros que más contribuyen a ello, vemos que para el caso del

grupo 4 (4.5-6% M.O.) las muestras presentan un similitud del 36.22%. Los géneros que más contribuyen a la similitud de las muestras son *Aspergillus* sp. (25.83%), *Acremonium* sp. (14.76%), *Fusarium* sp. (13.91%) y *Stemphylium* sp. (13.05%). Todos ellos están asociados con un comportamiento saprófito, lo que corresponde con niveles altos de M.O.

**Tabla 26:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 3, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo 3		
Similitud promedio: 44,53		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Acremonium</i> sp.	204,95	19,81
<i>Stemphylium</i> sp.	161,79	14,84
<i>Fusarium</i> sp.	132,78	14,80
<i>Aspergillus</i> sp.	190,28	13,50
<i>Penicillium</i> sp.	89,35	9,98
No Identificado	74,47	6,92
<i>Cladosporium</i> sp.	143,79	5,17
<i>Alternaria</i> sp.	49,05	2,73
<i>Humicola</i> sp.	60,46	2,61

Para el caso del grupo 3 (3-4.5% M.O.) (**Tabla 26**) la similitud entre sus muestras es mayor, lo cual encaja con la distribución de las muestras en el análisis MDS donde se observa una mayor homogeneidad en la distribución espacial de las muestras. El porcentaje de similitud es de un 44.53%. Los géneros que contribuyen en mayor medida a la similitud son *Acremonium* sp. (19.81%), *Stemphylium* sp. (14.84%), *Fusarium* sp. (14.80%), *Aspergillus* sp. (13.50%). Corresponden con los mismos géneros que el grupo 4, pero varían en abundancia y porcentaje de contribución a la similaridad. A su vez, el grupo 3, presenta una mayor riqueza de géneros, así como una mayor abundancia en todos ellos respecto a los niveles del grupo 4. Cabe destacar que la presencia de *Cladosporium* sp con una abundancia de 143.79, mayor que el tercer género que más contribuye a la similitud en este grupo, *Fusarium* sp. (132.78), tan solo aporte un 5.17% a la similitud de muestras. Este dato será relevante más adelante en la comparación de disimilitudes entre los diferentes grupos de %M.O.



**Tabla 27:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 2, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo 2		
Similitud promedio: 22,29		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	141,83	32,70
<i>Acremonium</i> sp.	74,19	21,08
<i>Fusarium</i> sp.	79,37	15,70
<i>Mucor</i> sp.	52,73	8,16
<i>Chaetomium</i> sp.	91,32	7,38
<i>Stemphylium</i> sp.	58,16	5,78

El grupo 2 (1.5-3 % M.O.) (**Tabla 27**) posee un porcentaje de similitud entre muestras del 22.29%. El género que más contribuye a este porcentaje de similitud es *Aspergillus* sp con un 32.70%, también es el más abundante respecto a los demás géneros, con el doble de abundancia en las muestras respecto al segundo género que más contribuye a la similitud de muestras. Este segundo género es *Acremonium* sp. (21.08%), seguido de *Fusarium* sp. (15.70%), *Mucor* sp. (8.16%), *Chaetomium* sp. (7.38%) y *Stemphylium* sp. (5.78%).

**Tabla 28:** Porcentaje de similitud (SIMPER) de las muestras procedentes de porcentaje de materia orgánica del grupo 1, abundancia de géneros fúngicos y su contribución a dicha similitud.

Grupo 1		
Similitud promedio: 28,64		
Géneros	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Cladosporium</i> sp.	76,80	28,37
<i>Acremonium</i> sp.	39,87	21,43
<i>Aspergillus</i> sp.	49,36	18,01
No Identificado	29,15	14,48
<i>Fusarium</i> sp.	35,71	10,26

Por último, el grupo 1 (0-1.5% M.O.) (**Tabla 28**) obtiene un 22.29% de similitud entre sus muestras. Cabe destacar que es la muestra con menor número de géneros y su abundancia presenta también los niveles más bajos. El género *Cladosporium* sp. es el

que más contribuye a la similitud, con un 28.37%, seguido de *Acremonium* sp. (21.43%), *Aspergillus* sp. (18.01%) y *Fusarium* sp. (10.26%).

Por último se analizaron, mediante el análisis SIMPER, las disimilitudes entre cada uno de los cuatro grupos de porcentaje en materia orgánica, dando lugar a las **Tablas 29, 30, 31, 32, 33 y 34**:

**Tabla 29:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 4 y 3 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos 4-3			
Disimilitud promedio = 59,31			
	Grupo 4	Grupo 3	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	141,57	190,28	11,38
<i>Stemphylium</i> sp.	137,25	161,79	9,90
<i>Acremonium</i> sp.	123,78	204,95	9,62
<i>Cladosporium</i> sp.	11,85	143,79	9,13
<i>Fusarium</i> sp.	125,72	132,78	7,15
<i>Penicillium</i> sp.	101,77	89,35	7,14
No Identificado	89,30	74,47	5,28
<i>Mucor</i> sp.	51,18	43,19	4,37
<i>Humicola</i> sp.	25,25	60,46	4,35
<i>Alternaria</i> sp.	44,81	49,05	3,79
<i>Gilmanella</i> sp.	34,54	36,21	3,64
<i>Staphylotrichum</i> sp.	31,66	45,18	3,52
<i>Trichoderma</i> sp.	16,30	25,68	2,69
<i>Drechlera</i> sp.	8,09	28,26	2,24
<i>Paecylomites</i> sp.	32,60	2,11	2,08
<i>Botryotrichum</i> sp.	11,66	13,26	1,81
<i>Phoma</i> sp.	11,86	20,92	1,75
<i>Stachybotrys</i> sp.	14,75	17,62	1,64

Como puede observarse en la **Tabla 29**, los grupos 3-4, presentan una disimilitud del 59.31%. Los géneros que presentan una mayor contribución a esta disimilitud son *Aspergillus* sp, con un 11.38%, seguido de *Stemphylium* sp con 9.90%, *Acremonium* sp con 9.62% y *Cladosporium* sp con un 9.13%. Tal y como se dijo antes, el género más relevante en la disimilitud de los grupos 3-4 es este último, ya que presenta una elevada diferencia de abundancia entre los grupos 3-4, 143.79 frente a un 11.85, de forma respectiva. A pesar de eso, contribuye a la disimilitud con un 9.13%, en cuarto

lugar, a pesar de que el género que más contribuye a la disimilitud 3-4 sea *Aspergillus sp*, el cual posee una abundancia de 190.20 en el grupo 3 y 141.57 en el 4.

**Tabla 30:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 4 y 2 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos 4-2			
Disimilitud promedio = 71,01			
	Grupo 4	Grupo 2	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus sp.</i>	141,57	141,83	14,86
<i>Stemphylium sp.</i>	137,25	58,16	9,91
<i>Fusarium sp.</i>	125,72	79,37	9,65
<i>Penicillium sp.</i>	101,77	20,47	8,61
<i>Acremonium sp.</i>	123,78	74,19	8,05
No Identificado	89,30	34,62	7,84
<i>Chaetomium sp.</i>	22,45	91,32	7,51
<i>Mucor sp.</i>	51,18	52,73	5,34
<i>Gilmanella sp</i>	34,54	24,21	3,63
<i>Alternaria sp.</i>	44,81	0,00	3,11
<i>Trichoderma sp.</i>	16,30	15,27	2,96
<i>Staphylotrichum sp.</i>	31,66	12,65	2,58
<i>Paecylomices sp.</i>	32,60	0,00	2,29
<i>Humicola sp.</i>	25,25	8,94	2,12
<i>Cladosporium sp.</i>	11,85	18,97	2,04

Los grupos 4-2, presentan una disimilitud del 71.01% (**Tabla 30**). Al analizar los géneros que contribuyen de manera más significativa a esta disimilitud encontramos los géneros de *Aspergillus sp* con un 14.86%, a pesar de tener una abundancia prácticamente idéntica en ambos grupos y de ser el que más contribuye a la similitud individual en estos grupos, con un 25.83% para el grupo 4 y de un 32.70% en el 2. También contribuyen a esta disimilitud los géneros *Stemphylium sp* (9.91%) y una gran diferencia en abundancia (137.25 en el grupo 4 y 58.16 en el 2), *Fusarium sp* (9.65%) y *Penicillium sp* (8.61%).

**Tabla 31:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 3 y 2 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos 3-2			
Disimilitud promedio = 70,00			
	Grupo 3	Grupo 2	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	190,28	141,83	14,51
<i>Acremonium</i> sp.	204,95	74,19	10,67
<i>Stemphylium</i> sp.	161,79	58,16	10,18
<i>Cladosporium</i> sp.	143,79	18,97	9,61
<i>Fusarium</i> sp.	132,78	79,37	7,79
<i>Chaetomium</i> sp.	2,11	91,32	5,95
<i>Penicillium</i> sp.	89,35	20,47	5,89
No Identificado	74,47	34,62	4,58
<i>Mucor</i> sp.	43,19	52,73	4,24
<i>Humicola</i> sp.	60,46	8,94	4,08
<i>Staphylotrichum</i> sp.	45,18	12,65	3,30
<i>Gilmanella</i> sp.	36,21	24,21	3,27
<i>Alternaria</i> sp.	49,05	0,00	3,20
<i>Drechlera</i> sp.	28,26	0,00	1,91
<i>Trichoderma</i> sp.	25,68	15,27	1,87

Para los grupos 3-2 (**Tabla 31**), se obtuvo una disimilitud del 70%. Cabe destacar los géneros *Aspergillus* sp, *Acremonium* sp, *Stemphylium* sp y *Cladosporium* sp por su mayor contribución a esta disimilitud, con unos porcentajes del 14.51%, 10.67%, 10.18% y un 9.61%, respectivamente. Cabe destacar, de nuevo, el papel de *Cladosporium* sp, con una presencia de 143.79 en el grupo 3 y de 18.97 en el 2. A su vez, la presencia de los géneros *Alternaria* sp y *Drechlera* sp en el grupo 3 respecto a su ausencia total en el grupo 2, parece interesante, ya que estos géneros únicamente se encuentran presentes en los dos grupos con mayor porcentaje en materia orgánica (4 y 3).

**Tabla 32:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 4 y 1 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos 4-1			
Disimilitud promedio = 79,98			
	Grupo 4	Grupo 1	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	141,57	49,36	13,84
<i>Stemphylium</i> sp.	137,25	0,00	10,60
<i>Fusarium</i> sp.	125,72	35,71	9,43
<i>Penicillium</i> sp.	101,77	17,00	9,43
<i>Acremonium</i> sp.	123,78	39,87	8,64
No Identificado	89,30	29,15	8,30
<i>Cladosporium</i> sp.	11,85	76,80	6,83
<i>Mucor</i> sp.	51,18	1,51	3,95
<i>Alternaria</i> sp.	44,81	13,05	3,58
<i>Chaetomium</i> sp.	22,45	16,70	2,93
<i>Gilmanella</i> sp.	34,54	4,63	2,75
<i>Trichoderma</i> sp.	16,30	2,50	2,72
<i>Paecylomices</i> sp.	32,60	0,88	2,44
<i>Staphylotrichum</i> sp.	31,66	0,00	2,42
<i>Botryotrichum</i> sp.	11,66	0,00	2,27

El mayor porcentaje de disimilitud lo encontramos en la comparación entre los grupos 4-1, con un 79.98% (**Tabla 32**). Son los géneros *Aspergillus* sp, *Stemphylium* sp, *Fusarium* sp y *Penicillium* sp, con unos porcentajes de contribución del 13.84%, 10.60%, 9.43% y 9.43%, respectivamente. Al corresponder estos grupos como los de mayor y menor porcentaje en materia orgánica, se observa un aspecto relevante en la abundancia de la microbiota fúngica, donde el grupo 1 presenta una gran abundancia de géneros, todos ellos por encima de los 100, en cambio los géneros presentes en el grupo 4, son muy escasos, ninguno de ellos supera los 80.

**Tabla 33:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 3 y 1 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos 3-1			
Disimilitud promedio = 78,69			
	Grupo 3	Grupo 1	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	190,28	49,36	13,34
<i>Stemphylium</i> sp.	161,79	0,00	12,18
<i>Acremonium</i> sp.	204,95	39,87	12,03
<i>Cladosporium</i> sp.	143,79	76,80	11,06
<i>Fusarium</i> sp.	132,78	35,71	8,81
<i>Penicillium</i> sp.	89,35	17,00	6,30
No Identificado	74,47	29,15	4,60
<i>Humicola</i> sp.	60,46	6,38	4,24
<i>Mucor</i> sp.	43,19	1,51	3,48
<i>Alternaria</i> sp.	49,05	13,05	3,44
<i>Staphylotrichum</i> sp.	45,18	0,00	3,43
<i>Gilmanella</i> sp.	36,21	4,63	2,76
<i>Drechlera</i> sp.	28,26	0,00	1,98
<i>Trichoderma</i> sp.	25,68	2,50	1,77
<i>Chaetomium</i> sp.	2,11	16,70	1,39

Al igual que la comparación entre los dos grupos anteriores, los grupos 3-1 presentan un alto porcentaje de disimilitud, 78.69% (**Tabla 33**). Los géneros que más contribuyen son, al igual que el caso anterior, *Aspergillus* sp (13.24%) y *Stemphylium* sp (12.18%). Le siguen *Acremonium* sp y *Cladosporium* sp con un 12.03% y 11.06%, respectivamente. En este caso y en el anterior, el género *Stemphylium* sp adquiere mayor importancia en la disimilitud dado a que el grupo 1 carece de su presencia.

**Tabla 34:** Porcentaje de disimilitud (SIMPER) entre los grupos de porcentaje de materia orgánica 2 y 1 en función de la microbiota fúngica contenida, así como la abundancia de géneros y su contribución a dicha disimilitud.

Grupos 2-1			
Disimilitud promedio = 77,81			
	Grupo 2	Grupo 1	
Géneros	Abundancia promedio	Abundancia promedio	Contribución (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	141,83	49,36	16,50
<i>Fusarium</i> sp.	79,37	35,71	14,31
<i>Cladosporium</i> sp.	18,97	76,80	11,56
<i>Chaetomium</i> sp.	91,32	16,70	10,94
<i>Acremonium</i> sp.	74,19	39,87	9,13
No Identificado	34,62	29,15	6,97
<i>Stemphylium</i> sp.	58,16	0,00	6,08
<i>Mucor</i> sp.	52,73	1,51	5,80
<i>Penicillium</i> sp.	20,47	17,00	4,05
<i>Gilmanella</i> sp.	24,21	4,63	3,72
<i>Trichoderma</i> sp.	15,27	2,50	1,97

En el análisis de los grupos 2-1, se obtiene un disimilitud del 77.81% (**Tabla 34**), una disimilitud bastante elevada, dada la similitud en % M.O. Esta gran disimilitud puede achacarse a las diferencias encontradas en la abundancia de los géneros presentes en cada uno de los grupos. Los géneros que más contribuyen a la disimilitud son *Aspergillus* sp, con un 16.50%, *Fusarium* sp (14.31%), *Cladosporium* sp (11.56%) y *Chaetomium* sp (10.94%). Cabe destacar el aspecto de la abundancia de géneros en unos grupos y otros. El género que más contribuye a la disimilitud entre grupos es *Aspergillus* sp, el cual tiene un gran presencia en el grupo 2 (141.83), en cambio en el grupo 1 es de 43.36. Con los otros tres géneros pasa lo mismo, en el grupo 2 presenta una mayor abundancia. Únicamente se invierte el efecto en el género *Cladosporium* sp, un importante saprófito. También es relevante la ausencia en el grupo 1 del género *Stemphylium* sp.

## 5.- Discusión

Para comprender e interpretar mejor los resultados de este trabajo, no sólo debe tenerse en cuenta la complejidad atribuida al suelo y anteriormente expuesta en el apartado de Revisión Bibliográfica, también hay que considerar la imperfección de las técnicas analíticas disponibles para la microbiología del suelo, imperfección secundada por la propia experiencia y por el trabajo de Martínez *et al.* (2009), que estudia la ecología de la microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos de pimiento del campo de Cartagena. De ésta manera, el método de las diluciones sucesivas ha sido objeto de muchas críticas por sus limitaciones, pero a pesar de ello, es considerado uno de los métodos más útiles y productivos para investigar algunos aspectos de la microbiología del suelo. Es, tal vez, el más útil para observar los cambios debidos a un tratamiento de incorporación de materia orgánica al suelo (Burges, 1960).

La literatura especializada es escasa en trabajos sobre la microbiota fúngica que habita un suelo agrícola en monocultivo en función del contenido en materia orgánica, tal y como en éste trabajo se ha planteado. Tampoco el tratamiento de los datos obtenidos es común en estudios de comunidades fúngicas de suelos agrícolas. En relación con éste último aspecto, por un lado se han aplicado algunos de los análisis univariantes y bivariantes más comunes (Correlaciones de Pearson, t-Student, ANOVA) a los distintos parámetros e índices clásicos que determinan de manera numérica la riqueza y diversidad de una población determinada, en nuestro caso la población de hongos incluidos en suelos agrícolas en monocultivo bajo invernadero. Y por otro, y como complemento, también se han realizado análisis multivariantes que consideran tantas variantes como géneros fúngicos identificados en los suelos analizados, y que, en principio, permiten identificar de manera más precisa la relevancia y/o contribución de cada género sobre la población total incluida en el mismo.

Al respecto, los resultados en bruto obtenidos en las evaluaciones realizadas -antes de aplicarle ninguno de los análisis estadísticos- nos determinan que, independientemente del contenido en materia orgánica, los géneros más comunes en los suelos de monocultivo de tomate y pepino de la provincia de Granada fueron *Aspergillus sp*, *Acremonium sp*, *Fusarium sp* y *Penicillium sp*, que aparecen en el



86.36%, 88.64%, 70.46% y 81.82% del total de suelos estudiados, respectivamente. Así mismo, también podemos afirmar que, de manera generalizada los suelos procedentes de explotaciones sitas en Fornes y Zújar, todas ellas con monocultivo de tomate, presentaron mayor contenido de MO (la mayoría superior al 4%) que los suelos procedentes de la Costa que sustentaban monocultivo de pepino, y que salvo alguna excepción, contenían mayoritariamente valores de MO inferiores al 1,5%.

Así mismo, el estudio de Martínez *et al.* (2009), en el que los autores estudiaron la microbiota fúngica en suelos de invernadero cultivados con pimiento en el Campo de Cartagena (Murcia), comparando las variaciones en suelos no tratados, y desinfectados empleando distintos desinfectantes químicos y mediante biosolarización, la microbiota fúngica general se redujo a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Penicillium*, siendo *Aspergillus* y *Fusarium* los más frecuentes y abundantes.

Haciendo uso de los análisis univariantes y bivariantes más comunes, podemos afirmar la existencia de una correlación entre el contenido en materia orgánica y la diversidad de la microbiota fúngica, que aunque débil en todos los casos, es mayor con respecto al número de géneros y otros índices de diversidad clásicos (Margalef, Sahnnon-Wiener y Simpson), que con el número total de hongos o el índice de equidad de Pielou. Así mismo, los análisis de la varianza (ANOVA y t-student) realizados con dichos índices en función de las distintas categorías que incluyen a los suelos analizados, nos reportan la existencia de diferencias en la diversidad fúngica de los mismos. Éstas diferencias aparecen principalmente entre las zonas de procedencia de las muestras, así como entre los grupos en función de su contenido en MO, pero también en función del cultivo soportado por dichos suelos, que en éste caso guarda una estrecha relación tanto con las zonas de muestreo, como con los grupos en función del contenido en materia orgánica, puesto que los suelos provenientes de monocultivo de pepino se encuentran todos en la zona denominada Costa, y que como ya avanzábamos en el anterior párrafo, han sido los suelos con menor contenido en MO. De éste modo, y de forma generalizada, las diferencias en diversidad fúngica aparecen en favor de los suelos con mayor cantidad de MO, en contraste con los suelos pobres en MO que muestran una menor diversidad. Así mismo, el contenido total de individuos/hongos

aparece superior en los suelos con valores de MO superiores al 1,5%, mientras que en éste caso, ni la categoría Zona de procedencia de las muestras ni tampoco la categoría Tipo de cultivo parecen determinar de manera significativa la cantidad de hongos contenidos en sus suelos.

El uso de paquetes informáticos que incluyen modelos estadísticos basados en análisis de datos multivariantes y que consideran tantas variantes como géneros fúngicos identificados en los suelos analizados, nos ha permitido identificar de manera más precisa la relevancia y/o contribución de cada género sobre la población total incluida en los mismos. Así, los resultados mostrados mediante Escalamiento Multidimensional No Métrico (MDS o NMDS), que es una técnica multivariante de interdependencia que trata de representar en un espacio geométrico de pocas dimensiones las proximidades existentes entre el conjunto de suelos estudiados en función de su microbiota fúngica, nos ha permitido detectar de manera gráfica posibles gradientes en las comunidades fúngicas de los suelos incluidos en las diferentes categorías consideradas en el estudio. De ésta manera, los resultados han mostrado mayor uniformidad en las comunidades fúngicas presentes en los suelos procedentes de Fornes y Zújar, con respecto a los suelos de la Costa, y por tanto, mayor uniformidad en los suelos de monocultivo de tomate que en los de pepino. Así mismo, los suelos con un contenido en MO superior al 3%, aún mostrando una mayor diversidad de hongos edáficos, también aparecen más próximos en el espacio gráfico representado por ésta técnica, que aquellos con un contenido inferior al 3% de MO. Estas diferencias mostradas de manera gráfica, han sido corroboradas por los resultados numéricos obtenidos en los análisis de similitud (ANOSIM), que determinan la existencia o no de diferencias significativas en función de las comunidades fúngicas presentes en los suelos incluidos en las distintas categorías. Del mismo modo, mediante análisis del porcentaje de similitud (SIMPER) a partir de las comparaciones por pares, se han obtenido resultados referentes al grado de similitud de los suelos incluidos en cada categoría, así como el grado de disimilitud entre las distintas categorías, y la contribución promedio de las UFC de cada género de hongos, para dicha similitud entre suelos de una misma categoría y disimilitud entre categorías. En éste sentido, en los suelos con mayor contenido en MO que presentan de forma generalizada más de diez géneros fúngicos (en algunos casos hasta 18 diferentes), y

por tanto aquellos procedentes de Zújar y Fornes, que son también los que sustentan monocultivo de tomate, la presencia de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Stemphylium* son los de mayor relevancia en su similitud, a la vez que en la disimilitud con las otras categorías (bajo contenido en MO, zona Costa y cultivo de Pepino). Por otro lado, en el caso de los suelos con bajo contenido en MO, procedente de la zona Costa y de cultivo de Pepino, los géneros *Cladosporium* y *Mucor*, que muestran gran relevancia en los mismos, junto con *Aspergillus*, *Acremonium* y *Fusarium* constituyen el total de géneros fúngicos que han sido identificados en los mismos.

En definitiva, las nuevas herramientas estadísticas que incluyen modelos matemáticos ideados para el estudio de la ecología de los organismos incluidos en ecosistemas concretos, aparecen prometedoras como complemento a las herramientas clásicas en el estudio de la estructura de las comunidades fúngicas de suelos cultivados bajo invernadero. De ésta manera, éstas herramientas aportan un conocimiento más profundo de las mismas, y por tanto nos pueden servir de ayuda en la difícil comprensión de la ecología de los hongos en suelos sometidos a prácticas agrícolas.

## 6.- Conclusión

1.- La adición de materia orgánica en fase de descomposición, tiene una estrecha relación con la comunidad fúngica del suelo. Así, a mayor contenido de materia orgánica en el suelo, mayor diversidad y mayor densidad de géneros fúngicos.

2.- Tanto en suelos enmendados con materia orgánica poco descompuesta, como en suelos no enmendados se repiten una serie de géneros fúngicos (*Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Penicillium* sp.). La diversidad puede ser limitada por la imperfección de las técnicas analíticas utilizadas.

3.- Las técnicas estadísticas utilizadas para analizar los datos obtenidos de los 44 suelos estudiados, son novedosas para ordenar las relaciones de los microorganismos edáficos aislados con el contenido de materia orgánica del suelo, y permiten ordenarlas con mayor coherencia.

## 7.- Referencias bibliográficas

- **Abrunhosa, L., R. Serra, and A. Venâncio.** 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7493-7496.
- **Aliev, K.** 2001. Current problems with regard to mechanization and greening of farming in Azerbaijan. *Mezhdunarodnyi Sel'skokhozyaistvennyi Zhurnal*, 5. 57–61.
- **Almendros, G.; Polo, A y Dorado, E.** 1983. Estudio de los compuestos húmicos de diversos tipos de compost preparados a partir de paja de trigo. *Agrochimica*, 27.
- **Alvarez, M.A.D., Gagne, S., Antoun, L.** 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 194–199.
- **Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143–169.
- **Anderson, G.** 1958. Identification of derivatives of deoxyribonucleic acid in humic acid. *Soil Science*, 86: 169-174.
- **Anderson, G.** 1961. Estimation of Purines and Pyrimidines in soil humic acid. *Soil Science*, 91: 156-161.
- **Atlas, R.M., Bartha, R.** 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin/Cummings, Redwood City, CA, 694 pp.
- **Baker, K.F., Cook, R.J.** 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman, San Francisco, 433pp.
- **Baker, G.C., J.J. Smith y D.A. Cowan.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55: 541-555.
- **Balestra, G.M., Misaghi, I.J.** 1997. Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of Microbiology Methods*, 30: 111-117.

- **Barón, R., Benitez, I. C., Gonzalez, J. L.** 1995. Influencia de la dosis creciente de un abono orgánico en un cultivo de trigo. *Agrochimica*, 5-6: 280-289.
- **Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A.** 2003. Epidemiology of toxin fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 722-722.
- **Benito, E.; Díaz-Fierros, F.** 1989. Estudio de los principales factores que intervienen en la estabilidad estructural de los suelos de Galicia. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 48: 229-253.
- **Boehm, M.J., Madden, L.V., Hoitink, H.A.J.** 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relation to *Pythium* damping-off severity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4171-4179.
- **Boehm, M.J., Wu, T., Stone, A.G., Kraakman, B., Iannotti, D.A., Wilson, E.G., Madden, L.V., Hoitink, H.A.J.** 1997. Cross-polarized magic-angle spinning <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of *Pythium* root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 162-168.
- **Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F.** 2009. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 136-144.
- **Bondarev, A. G., Kuznetsova, I. V.** 1999. The degradation of physical properties of soils in Russia and ways to minimize it. *Pochvovedeni Journal*, 9: 1126-1131.
- **Bouhot, D.** 1980. Le potentiel infectieux des sols: un concept, un modèle pour sa mesure, quelques applications. Thèse de doctoral, Université de Nancy I, Nancy, France.
- **Burges, A.** 1960. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 199pp.
- **Blair, J.M., Parmelee, R.W., Allen, M. F., McCartney, D.A., Stinner, B.R.** 1997. Changes in soil N pools in response to earthworm population manipulations in

- agroecosystems with different N sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 361-367.
- **Bremmer, H.** 1954. The extension of the Sommerfeld's formula for the propagation of radio waves over a flat earth to different conductivities of the soil. *Physica*, 20(1-6): 441-460.
  - **Bretones F.** 2003. El enarenado. En técnicas de producción en cultivos protegidos (Coord.: F. Camacho Ferre), Vol I: 109-118. Ed: Caja Rural Intermediterránea, Cajamar, Instituto de estudios Cajamar.
  - **Brickman, P. and Campbell, D. T.** 1971. Hedonic relativism and planning the good society. In M. H. Apley (Ed.), *Adaptation-level theory: A symposium* New York: Academic Press, 287-302pp.
  - **Carter, M.R.** 1992. Influence of reduced tillage systems on organic matter, microbial biomass, macro-aggregate distribution and structural stability of the surface in a humid climate. *Soil and Tillage Research*, 23(4): 361-372.
  - **Cooke, R. C. and Whipps, J. M.** 1980. The evolution of modes of nutrition in fungi parasitic on terrestrial plants. *Biological Reviews*, 55: 341-362.
  - **Courtois, S., C.M. Cappellano, M. Ball, F.X. Francou, P. Normand, G. Helynck, A. Martinez, S. J. Kolvek, J. Hopke, M.S. Osburne, P.R. August, R. Nalin, M. Guerineau, P. Jeannin, P. Simonet y J.L. Pernodet.** 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 49-55.
  - **Coventry, E., Noble, R., Mead, A., Whipps, J.M.** 2005. Suppression of *Allium white rot (Sclerotium cepivorum)* in different soils using vegetable wastes. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 101-112.
  - **Dalal, R.C.** 1998. Soil microbial biomass-what do the numbers really mean? *Australian Journal Experimental Agriculture*, 38: 649-665.
  - **De Cara, M., Diáñez, F., Santos, M., Fernández, E., Tello, J., Estrada, F., Montoya, S.** 2006. Presence of *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* Race 1 in soils cultivated with Melon in the State of Colima (Mexico). *Geomicrobiology Journal*, 23 (5): 319-322.

- **De Cara, M.** 2007. Los agentes incitantes del colapso del melón (*Cucumis melo* L.) en suelos cultivados de España, Guatemala, Honduras y México. Metodología sobre identificación y patogénesis. *Tesis Doctoral*. Universidad de Almería, 279 pp.
- **Dommergues, Y.; Mangenot, F.** 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cle Editeurs. Paris, 796 pp.
- **Duchaufour, Ph.** 1984. *Edafología I: Edafogénesis y clasificación*. Masson, Barcelona, 493 pp.
- **Duchaufour, Ph.** 1987. *Manual de edafología* Ed. Masson, S. A. 46pp.
- **Eguaras, I. J.** 2014. *Ibn Luyun: Tratado de agricultura*. Editorial Universidad de Almería. Almería, España, 302pp.
- **Escalante-Lozada, A., G. Gosset-Lagarda, A. Martinez-Jimenez y F. Bolivar-Zapata.** 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38: 583-592.
- **Fortún, C.; Fortún, A.** 1989. Diversos aspectos sobre el papel de la materia orgánica humificada en la formación y estabilización de los agregados del suelo. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 48: 185-204.
- **Fuentes Yagüe, J.L.** 1999. *El suelo y los Fertilizantes*. Eds. Mundi-Prensa. Ministerio de Agricultura y Pesca, Madrid, 352 pp.
- **Flowers, M., R. Lal.** 1998. Axle load and tillage effect on soil physical properties and soybean grain yield on a mollic ochraqualf in northwest Ohio. *Soil Tillage Research*, 48: 21–35.
- **Frossard, E.; Condon, L.M.; Oberson, A.; Sinaj, S.; Fardeau, J.C.** 2000. Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality*, 29: 15-23.
- **Garland, J.L., Mills, A.L.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2351–2359.



- **Garland, J.L.** 1997. Analysis and interpretation of community level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecological*, 24: 289-300.
- **Garret, S. D.** 1951. Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships. *New Phytopathology*, 50: 149-166.
- **Garret, S. D.** 1955. Microbial ecology of the soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 38: 1-9.
- **Garret, S. D.** 1956. Biology of root-infesting fungi. Ed. Cambridge University Press.
- **Garret, S. D.** 1970. Pathogenic Root-Infesting Fungi. Ed: Cambridge University Press. Great Britian.
- **Ginolhac, A., C. Jarrin, B. Gillet, P. Robe, P. Pujic, K. Tuphile, H. Bertrand, T.M. Vogel, G. Perriere, P. Simonet y Nalin, R.** 2004. Phylogenetic analysis of polyketide synthase Idomains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5522-5527.
- **Griffiths, E., Siddiqui, M. A.** 1961. Some factors affecting occurrence of *Fusarium culmorum* in the soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 44(3): 343-353.
- **Godfray, H. J. and Lawton, J. H.** 2001. Scale and species numbers. *Trends Ecology & Evolution*, 16: 400-404.
- **Gómez J. A, Juan Infante-Amate, Manuel González de Molina, Tom Vanwalleghem, Encarnación V., Taguas y Ignacio Lorite.** 2014. Olive Cultivation, its impact on soil erosion and its progression into yield impacts in southern Spain in the past as a key to a future of increasing climate uncertainty. *Agriculture*, 4(2): 170-198.
- **Handayani, W.** 1996. Soil carbon and nitrogen pools and transformations after 23 years of no tillage and convencional tillage. University of Kentucky, Lexington, 320pp.
- **Hamza, M. A., Anderson, W. K.** 2003. Responses of soil properties and grain yields to deep ripping and gypsum application in a compacted loamy sand soil contrasted with a sandy clay loam soil in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54: 273-282.

- **Hamza, M.A., Anderson, W.K.** 2005. Soil compaction in cropping systems: A review of the nature, causes and possible solutions. *Soil and Tillage Research*, 82(2): 121-145.
- **Handelsman, J.** 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 669-685.
- **Harley, J.L., Waid, J.S.** 1955. A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 38: 104- 118.
- **Haroun, J.A.; Hernández, E.** 1988. Efecto de los fertilizantes orgánicos sobre el cultivo de patatas y sobre las propiedades del suelo. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 47: 1171-1180.
- **Hashimoto, P.; Sierra, J.; Barberis, L.** 1989. Dinámica de la fracción ligera de la materia orgánica en relación a la producción de nitratos a campo. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 48: 1379-1392.
- **Hayes, M.H.B. y Himes, F.L.** 1994. Nature and properties of humus-mineral complexes. En Huang, P.M.; Schnitzer, M. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. *Soil Science Society of America, special publications*, 17: 59-76.
- **Haynes, R.J.; Mokolobate, M.S.** 2001. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanism involved. *Nutrient cycling in agroecosystems*, 59: 47-63.
- **Hernandez-Leon R, I Velazquez-Sepulveda, MC Orozco-Mosqueda, G Santoyo.** 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *PHYTON International Journal of Experimental Botany*, 79: 133-139.
- **Hernández. M.A.; Gasol, R.** 2004. Biodiversidad. Colección ciencias de la tierra. Tibidabo ediciones. Barcelona, España, 24 pp.

- **Hill G. T., N.A. Mitkowskia, L. Aldrich-Wolfe, L.R. Emelea, D.D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramireza, S.T. Lyncha, E.B. Nelsona.** 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15: 25-36.
- **Holtzclaw, K. M., and Sposito, G.** 1976. Analytical properties of the soluble metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures: extractrion and purification of fulvic acids. *Soil Science*, 40: 265-270.
- **Hoitink, H.A.J., Fahy, P.C.** 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 93-114.
- **Hu, S., Van Bruggen, A.H.C.** 1997. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of <sup>14</sup>C-labeled cellulose in soil. *Microbial Ecology*, 33: 134–143.
- **Hue, N.V.** 1992. Correcting soil acidity of a highly weathered Ultisol with chicken manure and sewage sludge. *Communications in Soil Science and Plant analysis*, 23: 241-264.
- **Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. and Bohannan, B. J. M.** 2001. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 399-406.
- **Hussain, I., Olson, K.R., Ebelhar, S.A.** 1999. Long-term tillage effects on soil chemical properties and organic matter fractions. *Soil Science Society of America Journal*, 63(5): 1335-1341.
- **Iyamuremye, F.; Dick, R.P.** 1996. Organic amendments and phosphorus sorption by soils. *Advances in Agronomy*, 56: 139-185.
- **Johson, L. F., Manka, K.** 1961. A modification of Warcup's soil-plate method for aislation soil fungi. *Soil Science*, 92: 79-84.
- **Kay, B.D.** 1997. Soil structure and organic carbon: a review. En Lal, R.; Kimble, J.M.; Follet, R.F.; Stewart, B.A. (eds.) *Soil Processes and the carbon cycle*. Symposium "Carbon sequestration in soils" Ohio State University, 624pp.
- **Komada, H.** 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Plant Disease*, 64: 450-454.
- **Komov, I.** 1789. *Agricultura*, Moscú.

- **Kononova, M. M.** 1982. *Materia orgánica del suelo: su naturaleza propiedades y métodos de investigación*. Edic. Oikos-Tau, S.A. 1ª Edición en español. Barcelona, España, 365 pp.
- **Konopka, A., Oliver, L., Turco Jr., R.F.** 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology*, 35: 103–115.
- **Kormondy, E. J.** 1973. *Conceptos de ecología*. Editorial Alianza. Edición en español. España, 19 pp.
- **Kögel-Knabner, I.** 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as input to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 139-162.
- **Labrador, J.** 1996. *La materia orgánica en los agrosistemas*. Madrid, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 174pp.
- **Larkin, R.P. and Honeycutt, C.W.** 2006. Effects of different 3-year cropping systems on soil microbial communities and Rhizoctonia diseases of potato. *Phytopathology*, 96: 68–79.
- **Lee SW, K. Won, H.K. Lim, J.C. Kim, G.J. Choi, y K.Y. Cho.** 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 720-726.
- **Leij, F. J., N. Toride, and M. Th. van Genuchten.** 1993. Analytical solutions for non-equilibrium solute transport in three-dimensional porous media, *Journal of Hydrology*, 151: 193-228.
- **Lockwood, J. L.** 1977. Fungistasis in soil. *Biological Review of Phytopathology*, 2: 341-362.
- **Lockwood, J. L.** 1988. Evolution of concepts asociated with soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 93-121.
- **Lodha, S.** 1995. Soil solarization, summer irrigation and amendmets for the control of *Fusarium oxysporum f. sp. Cumini* and *Macrophomina phaseolina* in arid soil. *Crop Protection*, 14: 215-219.

- **Ludwig, W., Bauer, S.H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I., Spring S., Hartmann, A., Schleifer, K.H.** 1997. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology*, 153: 181–190.
- **Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Millner, P.D.** 1983. Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology*, 73: 1543-1548.
- **Mackowiak, C.L.; Grossl, P.R.; Bugbee, B.G.** 2001. Beneficial effects of humic acids on micronutrient availability to wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 65: 1744-1750.
- **Magnoli C, Violante M, Combina M, Palacio G, Dalcero A.** 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters Applied of Microbiology*, 37(2): 179-184.
- **Maloney, P.E., van Bruggen, A.H.C., Hu, S.** 1997. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil. *Microbiology Ecological*, 34: 109–117.
- **Margalef, D.R.** 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics*, 3: 36-71.
- **Marschner, B.; Noble, A.D.** 2000. Chemical and biological processes leading to the neutralisation of acidity in soil incubated with litter materials. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 805-813.
- **Martínez M. A, Lacasa A, Tello J.** 2009. Ecología de la microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos y su interés agronómico. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Centro de publicaciones, Madrid, 374 pp.
- **Medina A., Mateo R., López-Ocaña L., Valle-Algarra F.M., Jiménez M.** 2005. Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4696-4702.
- **Mitsui, H., Gorlach, K., Lee, H.-J., Hattori, R., Hattori, T.** 1997. Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. *Journal of Microbiology Methods*, 30: 103–110.

- **Morgan, J.A.W., Winstanley, C.** 1997. Microbial biomarkers. In: Van Elsas, J. D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.) *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, 352pp.
- **McKellar, M.E., Nelson, E.B.** 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 452-460.
- **Mwendera, E. J., Saleem, M.A.M.** 1997. Hydrologic response to cattle grazing in the Ethiopian highlands. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 64: 33–41.
- **Odén, Sv.** 1919. Die Huminsäuren. *Kolloidchem Beiträge*, 11: 75-260.
- **Ohtomo, K., Tan, C.C.A.** 2001. Direct measurement of soil deformation using the bead-grid method. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 78: 325–332.
- **Olmos, S.; Esteban, E.; Lucena, J.J.** 1998. Micronutrient extraction in calcareous soils treated with humic concentrates. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 687-697.
- **Olsen, G.J., Woese, C.R.** 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal*, 7: 113–123.
- **Ongley, E.D.** 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Estudio FAO, riego y drenaje.. GEMS/Water Collaborating Centre; Canada Centre for Inland Waters, 55.
- **Øvreas, L.** 2000. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3: 236-251.
- **Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane y G.J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, 9: 1-55.
- **Papavizas, G. C., and Davey, C. B.** 1960. Some factors affecting growth of *Aphanomyces euteiches* in synthetic media. *American Journal of Botany*, 47: 758-765.
- **Parkinson, D.** 1957. New methods for the qualitative and quantitative study of fungi in the rhizosphere. *Pedologic Gand*, 7: 146-154.

- **Parkinson, D. Gray T.R.G., Williams, S.T.** 1971. Methods for Studying the Ecology of Soil Micro-organisms in (eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 31pp.
- **Penton R. C., V. V. S. R. Gupta, James M. Tiedje, Stephen M. Neate, Kathy Ophel-Keller, Michael Gillings, Paul Harvey, Amanda Pham, David K. Roget.** 2014. Fungal Community Structure in Disease Suppressive Soils Assessed by 28S LSU Gene Sequencing. *PLOS ONE*, 9(4): e93893.
- **Perez-Brandan C., J. Huidobro, B. Grumberg, M.M. Scandiani, A.G. Luque, J.M. Meriles, and S. Vargas-Gil.** 2013. Soybean fungal soil-borne diseases: a parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health. *Canadian Journal of Microbiology*, 60: 73-84.
- **Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R.** 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 94-101.
- **Pielou, E.C.** 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. Wiley-Interscience John Wiley & Sons, 285 pp.
- **Pochon, J.; de Barjac, H.** 1958. Traité de Microbiologie des sols. Applications Agronomiques. Ed: Dunod, Paris, 685 pp.
- **Ponomareva, V. V.** 1947. Métodos de extracción y naturaleza química de los fulvoácidos. *Pochvovedenie*, 12, 714pp.
- **Ponomareva, V. V.** 1949. Reacciones de interacción de los fulvoácidos con hidróxidos de bases. *Pochvovedenie*, 11, 638.
- **Porta C.** 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición, Ed. MundiPrensa, Madrid (España), 929 pp.
- **Raper, J. R.** 1968. On the evolution of fungi. In "The Fungi" (G. C. Ainsworth and A. S. Sussman, eds.) Vol. 3, Academic Press, New York, 677-693pp.
- **Rodríguez-Molina, M. C.** 1996. Ensayo de caracterización de suelos agrícolas y forestales de Extremadura tomando como indicadores a *Fusarium* Link y *Pythium* Pringsheim: La representatividad del muestreo. *Tesis Doctoral*, EPSIA Madrid, Madrid, 209 pp.

- **Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. Mc Neil, C. Minor, Ch.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman y R.M. Goodman.** 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2541-2547.
- **Russell, J.R., Betteridge, K., Costall, D.A., Mackay, A.D.** 2001. Cattle treading effects on sediment loss and water infiltration. *Journal of Range Management*, 54: 184–190.
- **Suhayda, C.G., Yin LiJuang, Redmann, R.E., Li Jiandong.** 1997. Gypsum amendment improves native grass establishment on saline-alkali soils in Northeast China. *Soil Use and Management*, 13: 43–47.
- **Scotto La Massesse, C.** 1983. Mesures susceptible d’apprécier et de limiter les effects de la fatigue des sols dans le cas de reconstitution des vergens. In: La fatigue des sols. Diagnostic de la fertilité dans le systèmes culturaux. Ed INRA Paris, 111pp.
- **Shannon, C.E; W. Weaver.** 1949. The Mathematical Theory of Communication. University Illinois Press, Urbana, IL, 54pp.
- **Simpson, E.H.** 1949. Measurement of Diversity. *Nature*, 163: 688.
- **Shmuk, A.** 1924. Aportación a la química de la materia orgánica del suelo, Trudy Kubansk. s.-j. in-ta, vol. 1, 2.
- **Schnitzer, M.** 1990. Selected methods for the characterization of soil humic substances. En: P. McCarthy y cols. (Ed.): Humic substances in soil and crop sciences. *American Society of America and Soil Science Society of America*. Madison: 65-89.
- **Schulten, H.R.; Schnitzer, M.** 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 1-15.
- **Skyllberg, U.** 1999. pH and solubility of aluminium in acidic forest soils: a consequence of reactions between organic acidity and aluminium alkalinity. *European Journal of Soil Science*, 50: 95-106.



- **Stevenson, J. L. y Schnitzer, M.** 1982. Transmission electron microscopy of extracted fulvic and humic acid. *Soil Science*, 133: 179-185.
- **Stevenson F. J., He X. T.** 1990. Nitrogen in humic substances as related to soil fertility. In: *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*. P. McCarthy, C. E. Clapp, R. L. Malcolm and P. R. Bloom (Eds.) Madison, WI: American Society of Agronomy, 109pp.
- **Szczech, M.M.** 1999. Suppressiveness of vermicompost against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 147: 155-161.
- **Szczech, M.M., Smolinska, U.** 2001. Comparison of suppressiveness of vermicompost produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. *Journal of Phytopathology*, 149: 77-82.
- **Tardieu, F.** 1994. Growth and functioning of roots and of root systems subjected to soil compaction. Towards a system with multiple signalling. *Soil and Tillage Research*, 30: 217–243.
- **Tate, R.L.** 1987. Soil organic matter: biological and ecological effects. New York, USA, John Wiley & Sons, 291 pp.
- **Tauson, V. O.** 1929. The oxidation of benzene hydrocarbons by bacteria. *Planta*, 7: 735-757.
- **Tisdall, J. M., Oades, J. M.** 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science*, 33: 141-163.
- **Tello, J. C, Lacasa, A.** 1990. *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Boletín de Sanidad Vegetal*, 19: 190.
- **Tello, J. C, Varés, F., Lacasa, A.** 1991. Análisis de muestras, 39-48. In: *Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. MAPA, Madrid, 485 pp.

- **Tello J.C., Palmero D, de Cara M, Moreno A, Santos M.** 2011. El suelo como “ente vivo” y su relación con las enfermedades de las plantas. En: Meco, R., Lacasta C., Moreno, M.M. (coords.) Agricultura Ecológica en Secano. Soluciones sostenibles en ambientes mediterráneos. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, SEAE, Ediciones Mundi-Prensa, 44pp.
- **Torsvik, V., Golsoyr, J., Daae, F.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 782–787.
- **Tunlid, A., Hoitink, H.A.J., Low, C., White, D.C.** 1989. Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1368–1374.
- **Theron, J. and Cloete, T. E.** 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Review of Microbiology*, 26: 37-57.
- **Thiele, H., Kettner, H.** 1953. Über Huminsäuren. *Kolloid-Zeitschrift*, 130(3): 131.
- **Thurnheer, T., Gmur, R. and Guggenheim, B.** 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 37-47.
- **Tribe, R.T.** 1957. Ecology of micro-organisms in soils as observed during their development upon buried cellulose film. In: *Microbial Ecology* (eds. R.E.O. Williams and c.c. Spicer). Cambridge University Press, Cambridge, 298pp.
- **Trusov, A. G.** Humificación de los compuestos que forman parte de los organismos vegetales, Selskoye Jos. Y Lesovodstvo, octubre, noviembre de 1914; abril, julio, noviembre de 1915; marzo, septiembre, octubre, noviembre de 1916.
- **Trusov, A. G.** 1917. Materiales para el estudio del humus. Procesos de formación del ácido húmico, Parte I, Petrogrado.
- **Trusov, A. G.,** 1916. Algunos procesos químico-biológicos que se verifican en la humificación de los restos vegetales, J. Opytnoy Agronomii, 17.
- **Tyurin, V., y Gutkina, E. L.** 1940. Data of Studies on Nature of Hulinins of Chemozem. *Trudy Pochv Instituto Dokuchaeva*, 23: 41-61.

- **Tyurin, I. V.** 1940. Acerca del problema de la naturaleza de los fulvoácidos del humus del suelo, Trudy Pochv. In-ta im. Dokuchayeva AN SSSR, 33.
- **Tyurin, I. V.** 1946. Participación cuantitativa de la materia viva en la composición de la parte orgánica del suelo, Pochvovedenie, núm. 1.
- **Tyson, G.W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E.E. Allen, R.J. Ram, P.M. Richardson, V.V. Solovyev, E.M. Rubin, D.S. Rokhsar y J.F. Banfield.** 2004. Community structure. *Nature*, 428: 37-43.
- **Urbano Terrón, P.** 1988. Tratado de fitotecnia general. Ed. Mundi prensa, 345 – 388pp.
- **Van Elsas, J.D., R. Costa, J. Jansson, S. Sjoling, M. Bailey, R. Nalin, T.M. Vogel y L. van Overbeek.** 2008. The metagenomics of disease-suppressive soils - experiences from the metacontrol project. *Trends in Biotechnology*, 26: 591-601.
- **Van Elsas, J.D.** 2010. A novel protocol for the metagenomic analysis of suppressive soil. *Journal of Microbiological Methods*, 83: 141-148.
- **Vaughan, D., Ord, B.G.** 1981. Uptake and incorporation of <sup>14</sup>C-labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*, 32: 679–687.
- **Waksman, S. A.** 1916. *Soil Science*, 2: 103-155.
- **Waksman, S. A.** 1917. *Soil Science*, 3: 565-589.
- **Waksman, S. A.** 1927. Principles of soil microbiology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. 897 pp.
- **Waksman, S.A.** 1935. Chemical nature of organic matter or humus in soils, peat bogs and composts. *Journal of Chemical Education*, 12(11): 511.
- **Waksman, S.A.** 1944. Microbial antagonisms and antibiotic substances. The Common wealth Foundation, New York, 339pp.
- **Walkley A, Black I. A.** 1934. An Examination of Degradation Method for Determining Soil Organic Matter: A Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37: 29-37.

- **Wang, G.Y., E. Graziani, B. Waters, W. Pan, X. Li, J. McDermott, G. Meurer, G. Saxena, R.J. Andersen y J. Davies.** 2000. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Organic Letters*, 10, 2(16): 2401-4.
- **Warcup, J. H.** 1951. The ecology of soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 34: 376-399.
- **Warcup, J. H.** 1960. Methods for isolation estimation of activity of fungi in soil. *In: Parkinson and Waid (eds.). The ecology of soil fungi.* Ed. Liverpool University Press, 3-18.
- **Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden, Gardener, B.B., Thomashow, L.S.** 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309–348.
- **Woese, C.R. y G.E. Fox.** 1977. The concept of cellular evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 10: 1-6.
- **Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.
- **Wollum, A. G.** 1982. Methods of soil analysis. Medison Wisconsin, USA, 781-801pp.
- **Workneh, F., van Bruggen, A.H.C., Drinkwater, L.E., Shennan, C.** 1993. Variables associated with corky root and Phytophthora root rot of tomatoes in organic and conventional farms. *Phytopathology*, 83: 581–589.

Considerando el modelo de producción intensiva de Almería, el suelo arenado (Bretones, 2003) constituye uno de los aspectos más relevantes de la horticultura almeriense. Esta técnica, ya citada en textos de la primera mitad del siglo XIV por el almeriense andalusí Ibn Luyun (Eguaras, 2014), proporciona una serie de ventajas y cualidades, en comparación con el suelo desnudo, que permitió potenciar el desarrollo hortícola a favor de una climatología benigna y de la superación de algunos factores limitantes (Bretones 2003). El arenado tradicional se caracteriza por presentar, un perfil artificial formado sobre el suelo original (tan solo cuando es necesario por deficiencias y/o carencias del terreno), y está constituido por un horizonte permeable de suelo de cañada, un horizonte nutritivo de estiércol y un horizonte protector de arena.

Las interacciones planta-microorganismos-suelo juegan un papel vital en el mantenimiento de la salud y de la productividad en cultivos agrícolas y hortícolas. Por ejemplo, son numerosos los estudios que reportan la existencia de suelos que, de forma natural, se muestran supresivos a una enfermedad incluso en presencia del patógeno, hospedador sensible y condiciones ambientales favorables para su expresión (Weller, *et al.*, 2002). Así, aunque son muchos los estudios dirigidos a la comunidad bacteriana, éste fenómeno ha sido atribuido a diversas comunidades microbianas, incluyendo también a hongos y protozoos. La gran diversidad funcional de los hongos edáficos y su capacidad para colonizar multitud de microhábitats, puede influir tanto en los niveles de patógenos como en la mejora de la salud y de la producción del cultivo. En éste sentido, Gupta y Reddy (2010) observaron los mayores índices de supresión de la enfermedad cuando los suelos presentaban alta diversidad de hongos.

Dado que los microorganismos juegan un papel decisivo en la fertilidad del suelo y puesto que la materia orgánica influye de manera directa sobre ellos, resulta interesante el conocimiento de la estructura de las comunidades microbianas presentes en distintos suelos agrícolas de las provincias de Almería y de Granada. Para ello, en el presente estudio se emplearán los índices o parámetros de diversidad más utilizados, con la intención de determinar la estructura de la comunidad fúngica de suelos agrícolas bajo invernadero, y relacionarla con el contenido de materia orgánica en los mismos.

