

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA
TEKNIKOA***

**ESTUDIO DEL EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS
DE DIFERENTES LEVADURAS**

presentado por

DANIEL EUGUI ARRIZABALAGA

aurkeztua

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
*GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN
INGENIARITZAN***

Enero, 2018

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi tutor Jon Veramendi por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su ayuda y disponibilidad durante su desarrollo y por todo lo que he aprendido en este tiempo. También quiero expresar mi gratitud a las personas del grupo de Agricultura Sostenible y Cambio Climático, y en especial a Alicia Fernández.

Por último, quiero agradecer también su apoyo a las personas de mi entorno más cercano, mi familia y amigos.

Índice

1. Resumen.....	4
2. Introducción	5
2.1. Situación actual de la Agricultura.....	5
2.2. Tendencias en la Agricultura	7
2.3. Aplicaciones e investigación de levaduras	9
3. Objetivos	11
4. Materiales y Métodos	12
4.1. Material vegetal	12
4.2. Hongos.....	12
4.3. Levaduras	12
4.4. Medios de cultivo	12
4.5. Germinación in vitro de <i>Nicotiana benthamiana</i> en presencia de levaduras vivas	13
4.6. Cultivo hidropónico de tomate inoculado con levaduras	14
4.7. Cultivo en invernadero de tomate inoculado con levaduras	15
4.8. Interacción hongo-levadura in vitro.....	16
4.9. Tratamiento Estadístico	17
5. Resultados y Discusión	18
5.1. Crecimiento in vitro de <i>Nicotiana benthamiana</i> en presencia de levaduras vivas.....	18
5.2. Efecto de levaduras vivas en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate en cultivo en invernadero	21
5.3. Efecto de levaduras vivas en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate en cultivo hidropónico	27
5.4. Interacción hongo-levadura <i>in vitro</i>	32
6. Conclusiones.....	38
7. Bibliografía	39

1. Resumen

The growing social concern for a free diet of chemical waste, together with the pressure of climate change and environmental pollution, make it necessary to search for alternative tools in agriculture that ensure the sustainability and safety of production. One of these tools with the greatest potential is the use of microorganisms and their derivatives. In the present study, the growth promoting effect of plants of a collection of 70 yeasts was evaluated. In vitro effects were studied in the improvement of the vigour of the *Nicotiana benthamiana* plant, the inhibitory effect of the growth of the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Verticillium dahliae*, and in vivo tests were carried out in greenhouse and in hydroponics with tomato plants (*Solanum lycopersicum*). A total of 18 yeasts promoted the growth of *Nicotiana benthamiana* in Petri dish or in septa plate, 1 yeast inhibited the growth; the fungus most susceptible to inhibition was *Verticillium dahliae*, with a total of 45 yeasts that inhibited its growth, compared to 10 yeasts in *Fusarium oxysporum* and 9 yeasts in *Botrytis cinerea*. Only one yeast out of the total of 70 in the collection had an inhibitory effect on the three fungi (yeast 32). None of the two yeasts tested in vivo promoted tomato growth, possibly due to an ineffective dose. The results indicated the potential of many of the yeasts to promote plant growth, and continue to study their mechanisms of action in greater depth.

La creciente preocupación social por una alimentación libre de residuos químicos, unida a la presión del cambio climático y la contaminación medioambiental, hacen necesaria una búsqueda de herramientas alternativas en la agricultura que aseguren la sostenibilidad y seguridad de la producción. Una de las herramientas con mayor potencial es el uso de microorganismos y sus derivados. En el presente estudio se evaluó el efecto promotor del crecimiento de plantas de una colección de 70 levaduras. Se estudiaron sus efectos in vitro en la mejora del vigor de la planta *Nicotiana benthamiana*, los efectos inhibidores del crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Verticillium dahliae*, y se realizaron ensayos in vivo en invernadero y en hidropónico con plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Un total de 18 levaduras promovieron el crecimiento de *Nicotiana benthamiana* en placa Petri o en placa septada, 1 levadura inhibió el crecimiento; el hongo más susceptible a la inhibición ha sido *Verticillium dahliae*, con un total de 45 levaduras que inhibieron su crecimiento, frente a 10 levaduras en *Fusarium oxysporum* y 9 levaduras en *Botrytis cinerea*. Tan solo una levadura del total de 70 de la colección tuvo un efecto inhibidor en los tres hongos (levadura 32). Ninguna de las dos levaduras ensayadas in vivo promovió el crecimiento de tomate, posiblemente debido a una dosis ineficaz. Los resultados indicaron el potencial de muchas de las levaduras para promover el crecimiento de plantas, y continuar estudiando en mayor profundidad sus mecanismos de acción.

2. Introducción

2.1. Situación actual de la Agricultura

Actualmente, la agricultura se enfrenta a una serie de desafíos sin precedentes para abordar diversos problemas, presentes y futuros, derivados de la actividad humana. Medioambientalmente, la actividad agrícola desarrollada hasta la actualidad ha sido el motor de la alimentación, a menudo a costa del medio ambiente. El uso y abuso de fertilizantes minerales y biocidas químicos ha producido contaminación de los suelos y las aguas, eutrofización de las masas de agua y pérdida de biodiversidad; a nivel agrícola se ha reducido la fertilidad de las tierras cultivadas, con la consiguiente reducción de rendimientos y el aumento de insumos destinados a compensarla, lo que acelera aún más el proceso. Los cambios producidos en la sociedad también tienen consecuencias considerables en la agricultura. El crecimiento de la población exige un aumento equivalente en la producción de alimentos, así como la urbanización y el envejecimiento de la población en los países industrializados dificultan la disponibilidad de mano de obra en estos ámbitos. Hoy en día, no hay duda de que la producción de alimentos y los sistemas de distribución actuales están fallando en la tarea de alimentar a la población mundial (FAO, 2017).

En la actualidad, uno de los desafíos más importantes en la agricultura es la gestión de las consecuencias ambientales del uso de fertilizantes minerales, sobre todo los más utilizados: nitrógeno, fósforo y potasio.

El nitrógeno es un elemento muy importante en la nutrición vegetal, ya que forma parte de las proteínas de cualquier ser vivo. A diferencia de otros elementos, las rocas terrestres tienen bajo contenido en este elemento; las dos fuentes principales de nitrógeno son el atmosférico (la atmósfera está compuesta en un 78% por este elemento), fijado diversos por géneros de bacterias; y los propios restos de seres vivos. En las plantas, el nitrógeno está directamente relacionado con el crecimiento vegetativo, de modo que es uno de los insumos más aplicados en la agricultura convencional. Esto, sumado al hecho de que puede perderse de diversas formas (inmovilización, desnitrificación, volatilización y lixiviación), hace que a menudo sea aplicado en exceso. Este uso del nitrógeno ha desequilibrado el ciclo del mismo ocasionando también, junto con el fósforo, la eutrofización de las aguas (Gruber & Gallaway, 2008). También el uso de biocombustibles con nitrógeno contribuye al cambio climático y al desequilibrio del ciclo del elemento (Gallaway et al., 2008).

Actualmente hay desarrolladas muy pocas herramientas que mejoran la eficiencia de aplicación y reduzcan las consecuencias ambientales. Una de ellas serían los productos inhibidores de la nitrificación, que son componentes que inhiben la actividad de las bacterias del suelo de género *Nitrosomas*, las cuales intervienen en la nitrificación (Zerulla et al., 2001).

La nutrición fosfórica de las plantas a medio plazo también es un tema de preocupación, ya que el fósforo es una fuente no renovable (Dawson y Hilton 2011; Cordell et al 2009; Powles y Yu 2010). Como consecuencia de esto, su precio se va incrementando con el tiempo (Dawson y Hilton 2011; Cordell et al 2009). El consumo global de fertilizante fosfórico era en el año 2014 aproximadamente 50 millones de toneladas (López-Redondo et al 2014), con un incremento calculado de 20 millones de toneladas para el año 2030 (Cakmak 2002; Vance et al 2003). Estimaciones recientes indican que la roca fosfórica, la apatita y otras materias primas usadas en la fabricación de fertilizantes fósforo (a menudo en depósitos finitos en China, USA y Marruecos), son cada vez más limitados (López-Redondo et al 2014).

El uso de fertilizantes fosfóricos se espera que se incremente globalmente, y particularmente en regiones tropicales y subtropicales, donde la tierra y el agua todavía están disponibles para la expansión de la agricultura, pero todavía hay predominancia de suelos ácidos con baja disponibilidad de fósforo (Goedert 1983).

Se estima que en un periodo de tiempo de entre 50 y 200 años se agotará, manteniendo el uso actual (Dawson y Hilton 2011; Cordell et al 2009).

Estos fertilizantes reciben especial atención debido a que juegan un rol esencial en los procesos metabólicos de cualquier organismo (Gilbert 2009). El Fósforo es un nutriente esencial que es requerido para el desarrollo y reproducción de las plantas, y es uno de los componentes esenciales de los fertilizantes requeridos para sostener la agricultura moderna. Para lograr cosechas altas se requieren inputs continuos de fertilizantes basados en ortofosfato (PO_4^{-3}) (Tilman et al 2002; Gianessi y Reigner 2007), si el propio suelo no puede proporcionarlo. Debido a los procesos de precipitación y mineralización, los niveles de fósforo inorgánico (la única forma en la que puede ser asimilado por las plantas) en muchos suelos es comúnmente subóptima. Aproximadamente el 70% de la tierra cultivada globalmente sufre deficiencias de esta forma de fósforo, haciendo la nutrición fosfórica de las plantas un área de investigación prioritaria (Cakmak 2002; Hinsinger 2001; Kirkby y Johnston 2008).

Como se ha visto anteriormente, la disponibilidad de fosfato para el crecimiento de las plantas está limitada en aproximadamente el 70% de los suelos cultivados, debido a su reactividad con los componentes del suelo y a su rápida conversión por bacterias a formas orgánicas, no asimilables por las plantas. Esto hace que solo el 20-30% del ortofosfato aplicado sea aprovechado por las plantas (Hinsinger 2001; Syers et al 2008).

Cuando se aplica fosfato como fertilizante, es rápidamente inmovilizado en el suelo debido a su gran reactividad con cationes tales como los de calcio y magnesio en suelos calcáreos, o aluminio y hierro en suelos ácidos. La abundancia de microorganismos del suelo también afecta a la nutrición de P de manera compleja: aunque micorrizas y algunos microorganismos pueden mejorar la adquisición de fósforo por la planta, algunas otras especies tienen efectos opuestos debido a su competencia y a su habilidad de convertirlo a formas orgánicas, no disponibles para la planta (Hinsinger 2001; Vance et al 2003).

Aun con una fertilización fosfórica bien diseñada, las raíces de las plantas no toman más del 30% del P aplicado, y el resto se pierde por fijación en el suelo o por la actividad microbiana. Esta situación ha llevado a una aplicación excesiva de fertilizantes, contribuyendo al enriquecimiento de nutrientes de las aguas, lo que provoca la eutrofización de las aguas (Correl 1998; Smith y Schindler 2009).

El tercer elemento más importante en la nutrición vegetal agrícola es el potasio, teniendo diversas funciones en las plantas, como la regulación osmótica, el correcto funcionamiento de los estomas o la fotosíntesis (Evans & Sorger 1966), también en la capacidad de competencia con malas hierbas (Tilman et al. 1999). Este elemento está presente en la mayoría de minerales arcillosos (micas, vermiculitas, smectitas...), y su capacidad de fijación en el complejo arcillo-húmico aumenta su disponibilidad y reduce sus pérdidas. A pesar de su importancia, el potasio ha sido menos estudiado que el nitrógeno o el fósforo (Tripler et al., 2006).

El cloruro de potasio es el fertilizante con mayor concentración de potasio, pero presenta el problema de que la extracción requiere gran cantidad de energía, además de que se produce como residuo cloruro sódico derivado del proceso, lo que supone un problema potencial de salinización de aguas y suelos si no se gestiona correctamente.

Por lo tanto, existen muchos desafíos pendientes todavía por acercarnos a una agricultura y alimentación globales y sostenibles. La FAO (2017) establece unos preceptos a adoptar para orientarnos a una mayor sostenibilidad: mejorar la eficacia en el uso de los recursos, realizar actividades directas destinadas a conservar, proteger y mejorar los recursos naturales, y reforzar la resiliencia de los ecosistemas. Estas ideas, a pesar de ser muy generales, marcan un camino a seguir.

2.2. Tendencias en la Agricultura

Debido a la situación en la que estamos, una serie de cambios comienzan a percibirse en el ámbito de la agricultura, algunos de los cuales ya están siendo efectivos en muchos lugares del mundo. Uno de ellos es la agroecología. Se podría definir la agroecología como un conjunto de conocimientos y técnicas que armonizan la actividad agrícola con el ecosistema, aprovechando procesos biológicos y sinergias entre los diferentes componentes del ecosistema agrícola y la sociedad. Según la FAO (2017), existen 10 elementos clave que constituyen la agroecología, de los cuales mencionaremos cuatro por tener relación más directa con el ámbito agrícola propiamente dicho: optimización del uso de recursos naturales, conseguir condiciones favorables en los suelos para la autorregulación del ecosistema, maximizar las especies y los recursos genéticos en el tiempo y el espacio en los sistemas alimentarios para que los diferentes elementos funcionen de forma armónica y promoción simultánea de las funciones ecológicas para sacar provecho de las sinergias en el sistema.

De la agroecología deriva la agricultura ecológica, que es un sistema agrario que busca la producción de alimentos de calidad y libres de residuos químicos, manteniendo unos entornos laboral, económico y medioambiental positivos, trabajando de forma integrada con los ecosistemas y empleando los recursos naturales y locales. Como se ve en la figura 1, en nuestro país la producción ecológica sigue una tendencia al alza desde el año 1991 hasta el 2015, tanto en superficie, donde pasó de 988.323 hectáreas en 2007 a casi el doble en 2015 (1.968.570); como en número de operadores totales, donde pasó de 18.226 productores y 2.061 transformadores en 2007 a 34.673 y 3.492 en 2015, respectivamente.

Además de la producción, el consumo ecológico también está en alza. En 2016 el consumo de productos ecológicos en España alcanzó los 1.685,5 millones de euros, significando un crecimiento del mercado interior del orden del 12,51%. Hay que señalar que este crecimiento no fue tan elevado como en el año 2015, cuando ascendió al 24,5% (figura 2).

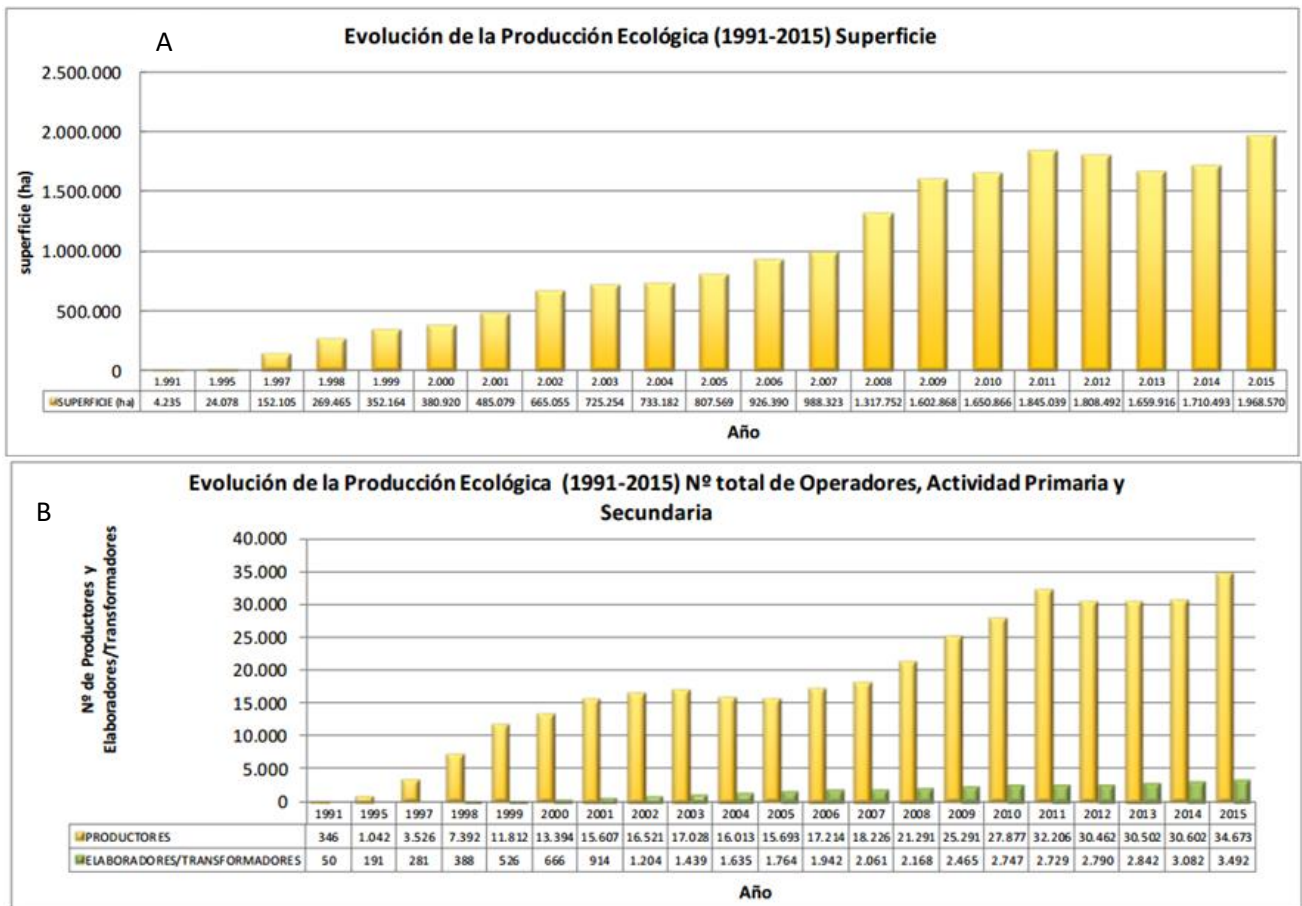


Figura 1: Evolución de la producción ecológica de 1991 a 2015 en Superficie (A) y en número de operadores totales (B). Fuente MAPAMA (2017).

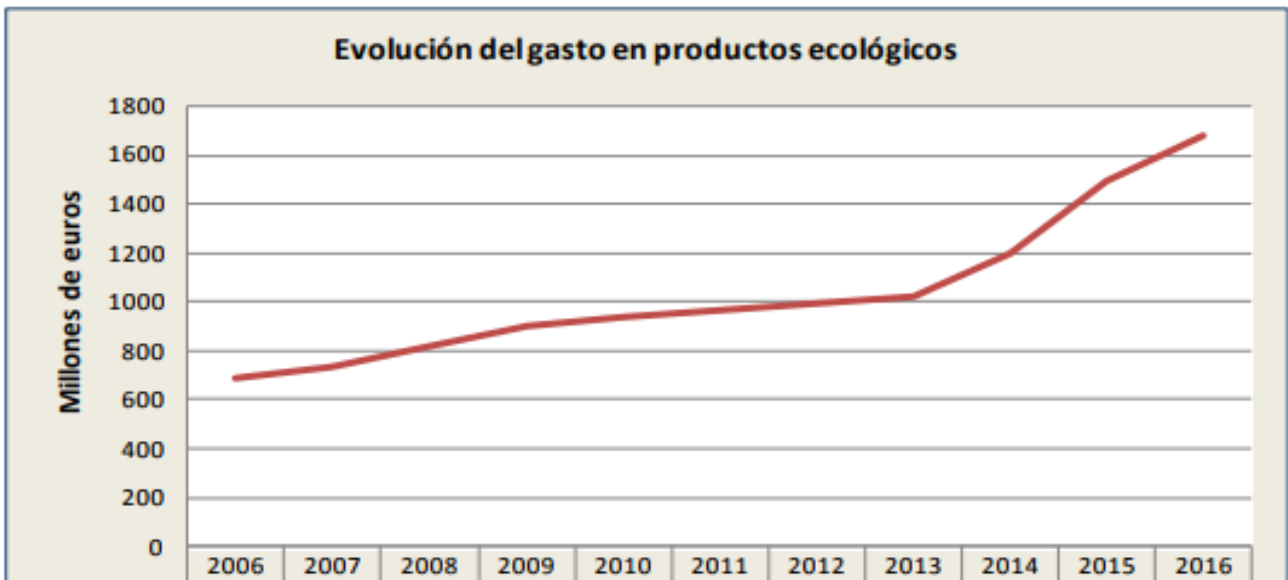


Figura 2: Evolución del gasto en productos ecológicos en España de 2006 a 2016. Fuente: MAPAMA (2017).

Esta tendencia a reducir el uso de productos químicos en la agricultura ha abierto la puerta a la investigación de alternativas más sostenibles, como por ejemplo el uso de productos basados en microorganismos y sus derivados. Un signo inequívoco de esta tendencia es la preparación del nuevo reglamento europeo sobre productos fertilizantes (estimado para el año 2020), que ha producido la modificación de toda la normativa estatal de cada país para contemplar el uso de productos basados en microorganismos y sus derivados. Este Real Decreto contempla el uso de microorganismos en fertilizantes, en cuyo caso el microorganismo debe estar registrado y probada su eficacia, se declare o no la especie en la etiqueta (Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales, Gobierno de España, 2017).

El uso de productos basados en microorganismos ayuda no solo a incrementar la fertilidad del suelo, la producción agrícola y la calidad nutritiva de los alimentos, sino que también mejora los agroecosistemas. Existen diferentes mecanismos, directos (producción de reguladores del crecimiento, supresión de hormonas del estrés o mejora en la captación de nutrientes) e indirectos (inhibición de patógenos) (Sarma, B. K. et al., 2015). Otro campo de interés posible es la biorremediación, ya que la mayoría de microorganismos promotores de crecimiento tienen el potencial de descontaminar suelos contaminados, y se pueden combinar con especies vegetales para lo mismo (Abhilash, P.C. et al., 2012), además de potenciar a éstas. Los productos más usados son los Biofertilizantes nitrogenados (*Rhizobium*, *azotobacter*, *azospirillum*) siendo el 80% de la demanda global de biofertilizantes, seguidos de los solubilizadores de fosfatos (*Bacillus*, *burkholderia*, *flavobacterium*). (Abhilash, P.C. et al., 2016).

Actualmente, se está estudiando el uso de bacterias y levaduras en diferentes ámbitos. Dos campos prometedores son las llamadas PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), que son bacterias de la rizosfera de plantas que tienen efectos promotores del crecimiento en plantas; y las levaduras. Se ha encontrado que muchas especies de las primeras tienen efectos como elicitores bióticos, fijadoras de nitrógeno atmosférico, estimuladores de crecimiento radicular, agentes de biocontrol, solubilizadores de nutrientes del suelo o promotoras del estrés abiótico en las plantas (Bhattacharyya & Jha, 2012; Nutaratat et al., 2014). En cuanto a las levaduras, se desarrollará en el siguiente apartado.

2.3. Aplicaciones e investigación de levaduras

La investigación sobre levaduras tal vez haya ido un paso por detrás hasta ahora de la referente a bacterias, pero actualmente está en alza. Las levaduras pueden tener diferentes vías para mejorar el crecimiento de las plantas, tanto de forma directa como indirecta. De forma directa, las levaduras pueden producir fitohormonas tales como el ácido indolacético o el ácido indolpirúvico, siendo el primero la forma más común de promoción del crecimiento de levaduras. De forma indirecta, las levaduras pueden producir antioxidantes que reduzcan los niveles de etileno, causante en muchas ocasiones de la pérdida de fruta almacenada; también son capaces de producir sideróforos, que son compuestos quelantes del hierro, aumentando la disponibilidad de este elemento para las plantas. Además, muchas especies de levaduras pueden actuar como biocontrol contra patógenos fúngicos, ya sea por competencia por los nutrientes y el espacio, formando una barrera física que evite la infección o produciendo compuestos antifúngicos o degradantes de pared celular (Nutaratat et al., 2014). Por esto último son especialmente interesantes para ser utilizadas en postcosecha de frutas, donde existen pocos productos que logren controlar eficazmente las enfermedades propias del almacenamiento. Además, el entorno de la fruta es un sustrato ideal para la supervivencia de la propia levadura, y que desarrolle competencia con los hongos patógenos de la fruta (El-

Tarabily, 2004). Estudios realizados han confirmado el potencial de estos organismos para ser utilizados en este ámbito, como la levadura *Metschnikowia pulcherrima*, que redujo la antracnosis de postcosecha en frutas de mango (Tian et al., 2017) o *Candida sake*, que redujo la infección de manzanas con el hongo *Penicillium expansum* (Carbó et al., 2017). La capacidad de muchas de estas levaduras de ser deshidratadas, almacenadas, transportadas y reactivadas para su uso suscita un gran interés. A pesar de los avances realizados, las aplicaciones comerciales aún son muy limitadas (Usall, J. et al., 2016), pero la preocupación del consumidor por el uso de biocidas químicos y las estrictas regulaciones de registro, aplicación y seguridad de estos productos suponen una oportunidad para productos biológicos de postcosecha (Usall, J. et al., 2016).

Desde hace unos pocos años en España se vienen comercializando numerosos productos biofertilizantes que contienen levaduras, aunque debido a que no estaban contemplados legislativamente hasta finales del año 2017, se comercializaban en el Grupo 4: “Otros Abonos y Productos Especiales” en las categorías 4.1.01: “Aminoácidos” o 4.1.02: “Abono con aminoácidos”. Esto presenta una dificultad a la hora de buscar productos biofertilizantes que declaren el uso de levaduras, aunque muchos puedan llevarlas en sus formulaciones.

En España hay comercializados al menos algunos productos que declaran el uso de levaduras en sus formulaciones, como el Nexy® (Lessafre, Lille, Francia) que emplea la levadura *Candida oleophila* o el Candifruit® (Sipcam Ibérica, Valencia, España), que emplea la levadura *Candida sake*, ambos productos para biocontrol en postcosecha. Otro producto es el llamado Fuego® (Biagro, Valencia, España) que tiene en su formulación levaduras del género *Saccharomyces spp* junto con bacterias beneficiosas, que se comercializa como bioestimulante. Este tipo de productos ofrecen la posibilidad de formularse en diversas formas, como concentrado soluble, suspensión concentrada o microcápsulas, entre otros. A pesar de ello, presentan diversos obstáculos para su comercialización, como son la inversión necesaria para el desarrollo y registro de los microorganismos y la supervivencia de los mismos en el producto para una correcta actividad.

No obstante, la nueva legislación nacional y la próxima legislación europea supone un avance importante para los microorganismos en la agricultura, y otorga herramientas para la comercialización de estos productos sin perder valor. También es un importante reclamo la seguridad y la biodegradabilidad, frente a los productos minerales o de síntesis química, que presentan otros problemas como el ser recursos no renovables, fuentes de contaminación ambiental, persistentes en los alimentos y nocivos para el ser humano en muchos casos. Las levaduras tienen un elevado potencial para ser empleadas en el ámbito agrícola, como herramientas útiles y necesarias para una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente, sin renunciar a las producciones necesarias para nuestra alimentación.

3. Objetivos

Objetivo general

Estudiar el efecto de una colección de 70 levaduras sobre el crecimiento y desarrollo de plantas.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de levaduras vivas en el crecimiento in vitro de plántulas de *Nicotiana benthamiana*
2. Analizar el efecto de levaduras vivas en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate
3. Evaluar el efecto de levaduras vivas en el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos

4. Materiales y Métodos

4.1. Material vegetal

Para estos ensayos se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad San Pedro, y semillas de *Nicotiana benthamiana*.

4.2. Hongos

Se emplearon cepas de diferentes hongos para cada uno de los ensayos. *Verticillium dahliae* fue aislado de una plantación comercial de pimiento. *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* fueron suministrados por el Laboratorio de Biología Vegetal de Villava, Navarra (España).

4.3. Levaduras

Este estudio se centra en un total de 70 levaduras empleadas en los ensayos. Las levaduras fueron proporcionadas por la empresa Lev2050 de Noáin, Navarra (España). Por razones de derechos de propiedad, en el presente trabajo no se identifican las distintas levaduras, sino que se les asigna un código numérico a cada una, del 1 al 70.

4.4. Medios de cultivo

P1

Sales Murashige & Skoog (Duchefa Biochemie, Holanda) 1,1 g/l, sacarosa 10 g/l, agar bacteriológico (VWR International, Bélgica) 15 g/l. Se ajustó el pH a 5,7. Se autoclavó en botellas de 1 l y se dispensó en placas Petri en cabina de flujo laminar.

P2

Sales Murashige & Skoog con vitaminas (Duchefa Biochemie, Holanda) 4,41 g/l, sacarosa 20 g/l, gelrite 2 g/l. Se ajustó el pH a 5,7, se añadió Phytigel (Sigma Aldrich Inc., Estados Unidos) 2 g/l. Se autoclavó en botellas de 1 l y se dispensó en placas Petri en cabinas de flujo.

Potato Dextrose Agar (PDA)

Preparado Potato Dextrose Agar (Laboratorios Conda S.A., España) 39 g/l. Se disolvió en agua desionizada, se autoclavó en botellas de 1 l y se dispensó en placas Petri en cabina de flujo.

Yeast Mold Agar (YMA)

Preparado Yeast Mold Agar (Laboratorios Conda S.A, España) 40 g/l. Se disolvió en agua desionizada, se autoclavó en botellas de 1 l y se dispensó en placas Petri en cabina de flujo.

Yeast Peptone Dextrose (YPD)

Glucosa 20 g/l, peptona 20 g/l extracto de levadura (Duchefa Biochemie, Holanda) 10 g/l. Se ajustó el pH a 6,5. Se dispensó a razón de 50 ml por matraz en matraces de 250 ml. Se taparon con papel de aluminio y se autoclavaron.

4.5. Germinación in vitro de *Nicotiana benthamiana* en presencia de levaduras vivas

Tal y como venía descrito en experimentos similares anteriores (Fu et al., 2016), en primer lugar, se desinfectaron superficialmente las semillas de *Nicotiana benthamiana* en un tubo Eppendorf de 2 ml, con 750 μ l de agua ultrapura, 250 μ l de lejía comercial y 1 gota de Tween 20, y en condiciones de agitación en Thermomixer (Eppendorf) a temperatura ambiente (20°C) durante 20 minutos.

Tras la desinfección, se aclararon con agua estéril y se pusieron a germinar en placas Petri con medio P2. Después de 12 días, se colocaron en placas Petri con medio P1 un total de 8 plantas por placa, cuidando que todas las plántulas tuvieran un desarrollo vegetativo similar. Se dispusieron 8 plántulas de forma horizontal a 1,5 cm del borde de la placa, y se inoculó la levadura correspondiente en una línea paralela a la primera, a una distancia aproximada de 1 cm del borde inferior (Figura 3). Se inocularon las levaduras en las placas (Figura 3). Se prepararon dos placas para cada levadura, una se selló con parafilm y otra con cinta porosa leukopore que permite el intercambio gaseoso. Se prepararon también placas con plántulas de *Nicotiana benthamiana* sin levaduras como controles.

Inicialmente se hizo un ensayo previo con las 70 levaduras. Se descartaron aquellas que producían fitotoxicidad u otros efectos nocivos en las plantas, y se procedió a repetir el ensayo con aquellas seleccionadas.

De estos ensayos previos se seleccionaron un total de 24 levaduras. Se cultivaron dos placas por levadura, una sellada con parafilm y otra con leukopore (cinta porosa), y se cultivaron 6 placas con plantas sin levadura, 3 de ellas con parafilm y otras 3 con cinta leukopore, sumando un total de 54 placas.

Condiciones ambientales

Se cultivaron todas las placas verticalmente en cámara de cultivo de forma que las plantas quedaran en la parte superior y la levadura en la inferior (Figura 3), a 21°C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Toma de datos

A los 15 días se anotaron datos visuales relativos al color y estado de las plantas y de la levadura, la longitud y ramificación de las raíces, indicando si son más, menos o igual de vigorosas que los controles. Se anotó también el peso fresco de la parte aérea y de la parte radicular, tras retirar con cuidado el agua condensada.



Figura 3: Placa 1 de cultivo de plántulas de *Nicotiana benthamiana* con la levadura 17 el día 15 del experimento

4.6. Cultivo hidropónico de tomate inoculado con levaduras

Se sembraron tomates de variedad San Pedro en semilleros con sustrato perlita, y tras una semana se trasladaron a macetas de 1 l en fitotron con el mismo sustrato. Se realizaron tratamientos semanales con las levaduras 1, 15, 16, 22, 26, 27, 63 y 65 en concentraciones del orden de 50.000 ufc/ml. Se prepararon 4 macetas por tratamiento, y se cultivaron 8 macetas control, que no fueron tratadas con ninguna levadura, haciendo un total de 40 plantas. Se dispusieron cada 4 macetas en una bandeja y se regaban periódicamente con solución Hoagland 0,5X para que permanecieran siempre húmedas. Se lavaron semanalmente las bandejas para eliminar las sales precipitadas.

Condiciones ambientales

Tanto para la germinación como durante el resto del ensayo, las condiciones del fitotron eran 28°C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Preparación de las levaduras y tratamiento

Las levaduras se cultivaron en matraces con 50 ml de medio YPD durante 3 días, en agitación a 110 rpm a 28°C. Posteriormente se centrifugaron en tubos durante 10 minutos a una temperatura de 15°C y a una velocidad de 10.000 g.

Tras descartar el sobrenadante, se realizaron dos lavados con 10 ml de agua, con otra centrifugación tras cada uno de ellos. Se resuspendieron en 5 ml de agua y se realizó a continuación el conteo de células de cada extracto.

Para ello se empleó el equipo TC 20 BIO RAD (Bio-Rad Laboratories. California, Estados Unidos). Se prepararon en tubos de 1,5 ml las siguientes diluciones de los extractos de las levaduras en agua: 1:20, 1:200 y 1:2000. Se tiñeron 10 µl de cada dilución con 10 µl del colorante Trypan blue, y se realizó el conteo. Una vez se conoció el número de células vivas de cada dilución, se prepararon las diluciones destinadas al tratamiento.

Cada planta se trató semanalmente con 25 ml de la dilución correspondiente (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000). La dilución se vertió en la zona más cercana al tallo. Los controles se regaron con 25 ml de agua.

Toma de datos

Desde el trasplante se anotaron semanalmente datos relativos a la altura de la planta desde los cotiledones hasta el ápice (cm).

El ensayo finalizó a la semana 6 desde el trasplante. Se tomaron datos relativos a la altura de la planta de igual forma que las semanas anteriores, el diámetro del tallo a la altura de los cotiledones con un calibre, el número de hojas, el contenido en clorofila con el medidor MINOLTA SPAD-502 de la segunda hoja más joven, el peso fresco y el peso seco (tras 3 días en estufa a 60°C) de la parte aérea y de la parte radicular, y la longitud de la parte radicular.

Presencia de microorganismos en la rizosfera

Para comprobar que las levaduras con las que se han tratado los tomates realmente han colonizado la rizosfera de las plantas, se procedió, una vez cortada la parte aérea pero antes de pesar la parte radicular, a realizar dos lavados con 500 ml de agua destilada y un lavado con 200 ml de PBS 1x. Después de estos lavados, se introdujeron las raíces en tubos falcon de 50 ml con 50 ml de agua estéril, y se dejaron reposar 30 minutos agitando regularmente.

Pasados los 30 minutos, se midió el pH del agua resultante con bandas de pH, se extrajeron las raíces para pesar, y se prepararon en tubos Eppendorf de 1,5 ml diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 de la disolución de raíces, 1 ml cada una. Se inocularon 100 µl de cada dilución en placas Petri con medio YMA con estreptomina a 450 mg/l. Se inocularon también las levaduras aisladas en el mismo medio, para poder reconocerlas visualmente en las placas de raíces. Se incubaron todas las placas a 28°C en oscuridad durante 5 días, y se realizó un conteo visual del número de colonias de levaduras totales y del número de colonias de las levaduras inoculadas en cada placa.

4.7. Cultivo en invernadero de tomate inoculado con levaduras

Se sembraron tomates de variedad San Pedro en semilleros con sustrato de turba y perlita en proporción 3:1, y tras una semana se trasplantaron a macetas de 3 l en invernadero con el mismo sustrato. Se realizaron tratamientos semanales con las levaduras 1 y 15, a partir de la primera semana tras el trasplante, con diferentes diluciones para conseguir órdenes de 5.000.000 ufc/ml (1:1), 500.000 ufc/ml (1:10), 50.000 ufc/ml (1:100) y 5.000 ufc/ml (1:1000). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, y se cultivaron 6 macetas control, que no fueron tratadas con ninguna levadura, sumando un total de 30 macetas.

Preparación de las levaduras y tratamiento

Se repitió el mismo protocolo que para el tratamiento del tomate del fitotron, con la diferencia de que las diluciones deseadas eran las mencionadas anteriormente, y se trataba con 25 ml por planta. La dilución se vertía en la zona más próxima al tallo, para que al realizar los riegos en la periferia de la maceta no lavara o arrastrara las posibles levaduras presenten en la rizosfera de la planta.

Toma de datos

Desde el trasplante se anotaron semanalmente datos relativos a la altura de la planta desde los cotiledones hasta el ápice (cm), la longitud de la hoja mayor (cm), el número total de hojas de al menos 3 foliolos, el contenido en clorofila con el medidor MINOLTA SPAD-502 de la segunda hoja más joven, y la fecha de apertura de la primera flor.

Tras cinco semanas de tratamiento, se midió el diámetro del tallo a la altura de los cotiledones, se cosechó la parte aérea cortada a dicha altura y se contó el número de ramas florales de cada planta. Se pesó en fresco y en seco, tras permanecer cinco días en una estufa a 50°C.

Presencia de microorganismos en la rizosfera y el sustrato

Se tomaron muestras de suelo de los controles 4, 5 y 6, y de las repeticiones más concentradas de levaduras. Se añadió agua desionizada a una muestra de 2,5 g de suelo, hasta los 50 ml y se homogeneizó la muestra. Se filtró la mezcla con Miracloth de 22 μm de diámetro de poro, y se prepararon cuatro diluciones de 1 ml con agua: 1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000. Se pipetearon 100 μl de cada dilución en una placa con medio YMA con estreptomycin a 450 mg/l, y además 100 μl de la dilución 1:100 en una placa con medio YMA sin antibiótico. Para detectar la presencia de las levaduras 1 y 15 en las colonias de las muestras, se cultivaron las levaduras en medio YMA.

Tras recoger las muestras de suelo, se realizaron a las raíces dos lavados con 1L de agua Milli RO para eliminar el sustrato, seguidos de un lavado con 200 ml de tampón fosfato salino (PBS). Se introdujeron las raíces en botellas de 250 ml con 200 ml de agua ultrapura, y se dejaron durante 30 minutos, agitando regularmente. Se midió el pH del agua, se filtró la mezcla y se plaqueó de igual forma que las muestras de suelo. Tanto las placas de suelo como las de raíces se cultivaron a 28°C en oscuridad durante 3 días, tras los cuales se contó el número de levaduras por placa. Se analizó si alguna de dichas levaduras se correspondía con las usadas en los tratamientos.

4.8. Interacción hongo-levadura in vitro

Se realizó el cocultivo de diferentes hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Verticillium dahliae*) con las 70 levaduras del ensayo en medio PDA. Se dispusieron discos de los hongos realizados con sacabocados de 1 cm de diámetro en placas Petri, a 1,5 cm del borde superior, y la levadura se inoculó a 5 cm del borde superior en una franja de 6 cm (Figura 4), tal y como viene descrito en anteriores experimentos (Rosa et al., 2010).

Condiciones ambientales

Se cultivaron las placas a 28°C en oscuridad durante 12 días, marcándose el frente del hongo con rotulador cada 2 o 3 días.

Toma de datos

Finalmente, se midió el avance del frente del hongo en todas las fechas marcadas, desde el centro del disco hasta el borde del micelio de forma perpendicular a la línea inicial de la levadura. La toma de datos se realizó a los 14 días en *Fusarium oxysporum*, a los 23 días en *Botrytis cinerea* y a los 30 días en *Verticillium dahliae*.



Figura 4: Placa de cultivo de *Verticillium dahliae* (área superior oscura) con la levadura 32 (línea inferior) el día 21 del experimento.

4.9. Tratamiento Estadístico

Tras obtener los datos se procedió a efectuar una normalización de los mismos para realizar las pruebas T de Student que permitieran determinar las diferencias significativas en las características estudiadas en los ensayos, con un nivel de significación del 0.05. Para ello se empleó el programa estadístico SPSS.

Es conveniente señalar que el requisito de homogeneidad de varianzas para poder realizar esta prueba paramétrica no se cumplió, al disponer en la mayoría de los casos, de solo 3 repeticiones.

5. Resultados y Discusión

5.1. Crecimiento in vitro de *Nicotiana benthamiana* en presencia de levaduras vivas

La interacción entre levaduras y *Nicotiana benthamiana* se observó como la influencia de las primeras en el peso de las segundas, tanto el de la planta entera como el de las partes aérea y radicular. Se realizó un experimento en placas Petri midiéndose el peso fresco de la parte aérea y de la parte radicular, y se realizó un segundo experimento con placas septadas, separando en diferentes celdas las plantas de las levaduras, para conocer si el mecanismo de interacción se debía a la liberación de sustancias volátiles o a la difusión de compuestos al medio de cultivo. En este segundo experimento se midió el peso fresco de la planta completa.

En el primer experimento, se obtuvo que las levaduras 26 y 35 aumentaban significativamente el peso de la parte aérea, las levaduras 27, 31, 32 y 65 aumentaban el peso de la parte radicular de forma significativa, mientras que las levaduras 1, 13 y 18 aumentaban el peso de forma significativa en ambas. Las más destacadas en el aumento de peso de la parte aérea fueron las levaduras 13 (aumento del 129,34%) y 16 (aumento del 131,69%), mientras que las más destacadas en el aumento de peso de la parte radicular fueron la 1 (aumento del 471,96%) y la 27 (aumento del 440,68%) (Figuras 5 y 7).

En el segundo experimento (placas septadas), se obtuvieron diferencias significativas en las siguientes levaduras: 1, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 22, 25, 26, 31, 32, 33, 35, 53, 56, 63, 65 y 67. Las más destacadas fueron la 13 (aumento del 96,98%), la 18 (aumento del 92,68%), la 32 (aumento del 88,93%) y la 35 (aumento del 87,58%) (Figura 8 y 9).

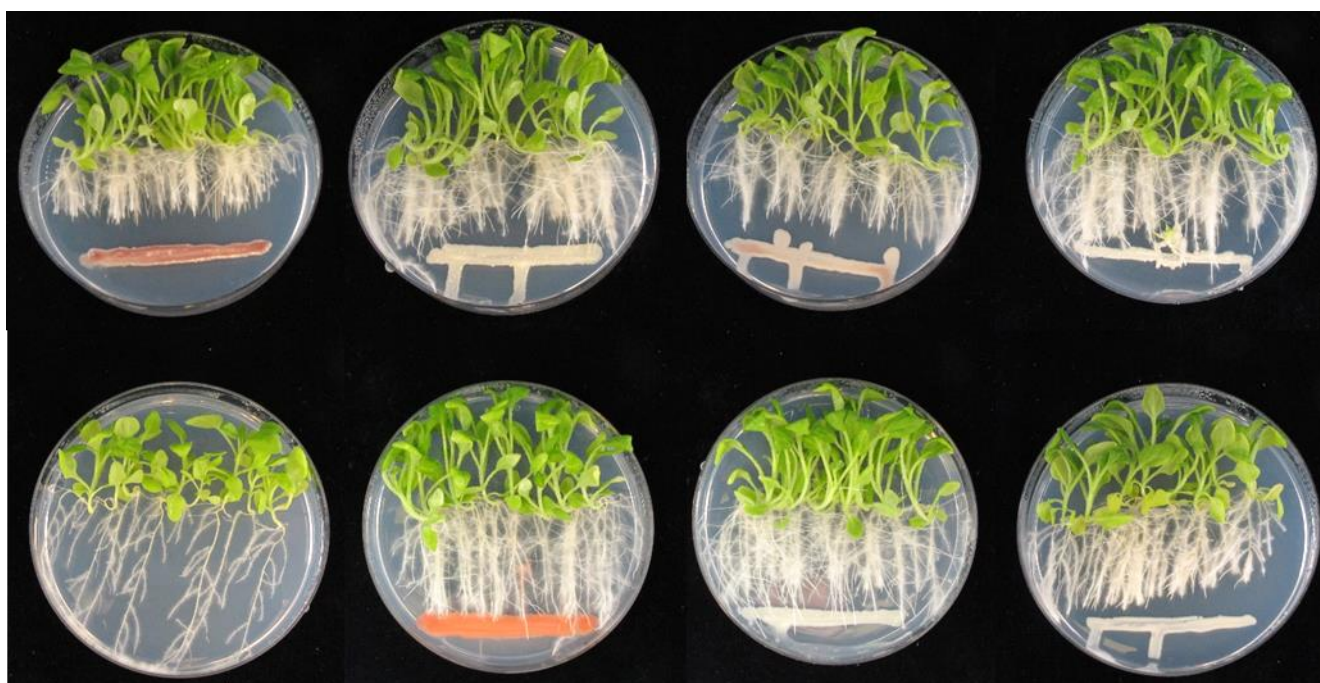


Figura 5: Fila Superior: de izquierda a derecha, placas de *Nicotiana benthamiana* con las levaduras 35*, 65*, 16*, 26*. Fila inferior, de izquierda a derecha: placas de *Nicotiana benthamiana* con levadura (Control), y con las levaduras 1*, 13*, 27*.

En ocasiones, algunas levaduras parecieron producir algún tipo de toxicidad en la planta, aunque no fue valorada de ninguna forma más allá del peso de las plantas (Figura 6).



Figura 6: placa de *Nicotiana benthamiana* con la levadura 17 (izquierda) y placa control sin levadura (derecha).

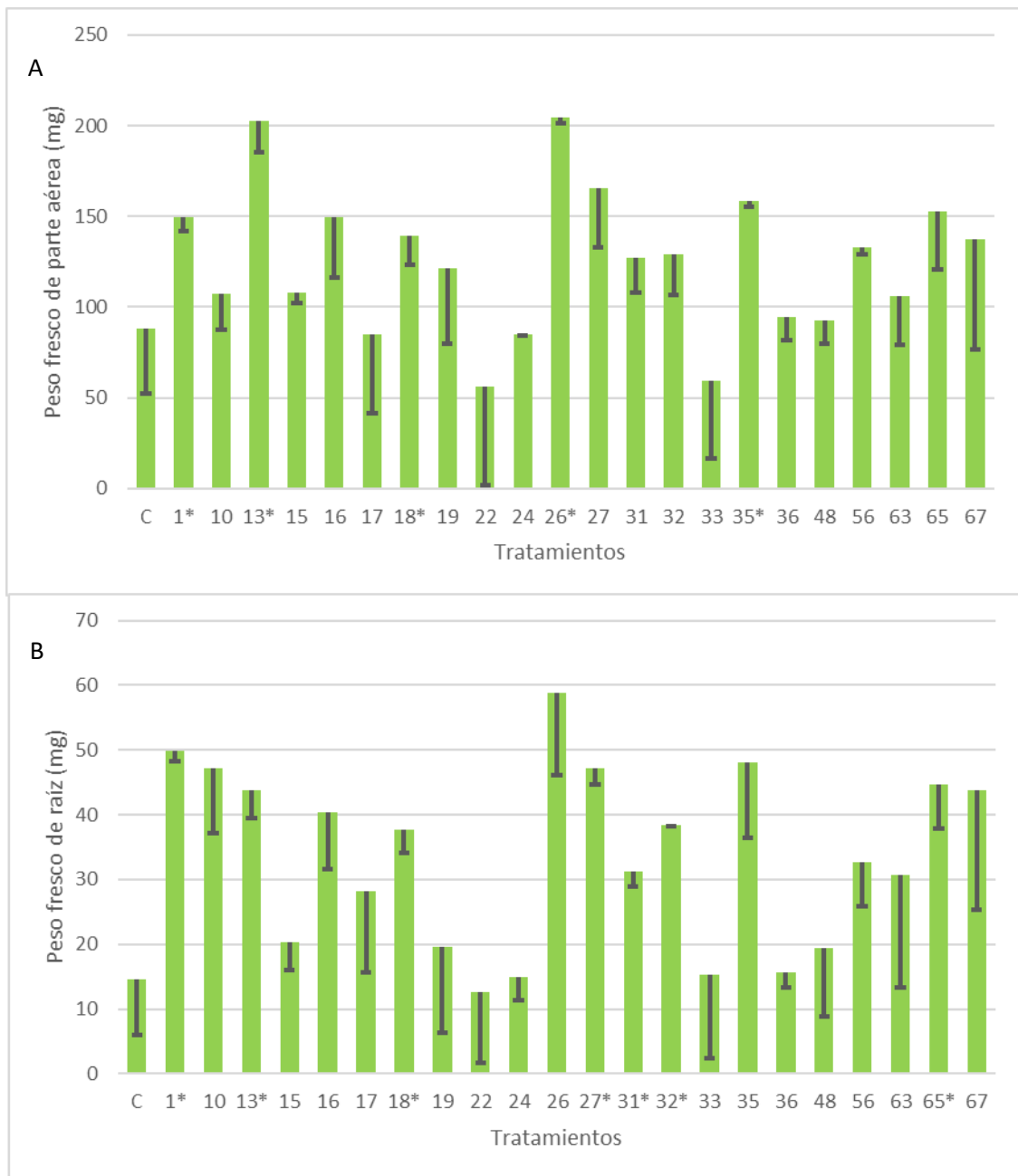


Figura 7: A: Peso fresco de la parte aérea de plantas de *Nicotiana benthamiana* crecidas en presencia de levaduras. B: Peso fresco de la parte radicular. (Tratamientos n=2 muestras. Control N=5 muestras).

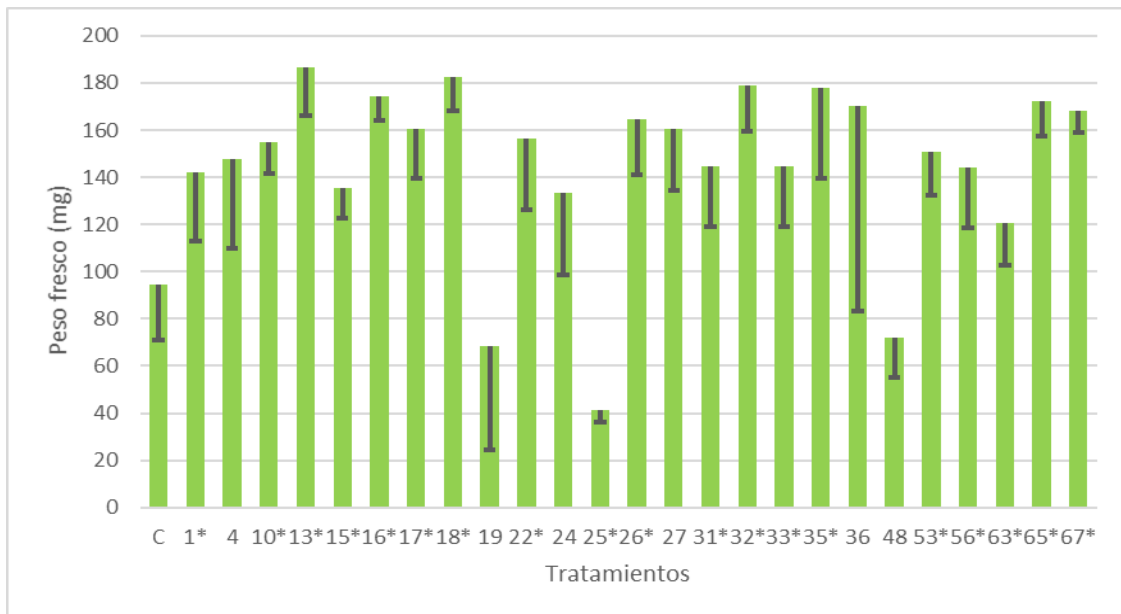


Figura 8: peso de las plantas de *Nicotiana benthamiana* crecidas en presencia de levaduras en placas septadas (Tratamientos n=4 muestras. Control N=16 muestras).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Sun en ensayos similares con la planta *Arabidopsis thaliana*, en los que el ácido indolacético producido por las levaduras con las que se cultivó aumentó el número de raíces laterales e inhibió la elongación de las raíces primarias, aumentando la capacidad de la planta de captar nutrientes, características que, a diferencia del presente experimento, no aumentaron la biomasa de las plantas (Sun et al., 2014).

El mismo grupo de investigación amplió los ensayos, y obtuvieron unos resultados que apoyaban la presencia de rutas metabólicas que biosintetizaban ácido indolacético en algunas levaduras. Se crecieron plántulas de *Nicotiana benthamiana* con levaduras del mismo modo que en el presente experimento, y se obtuvo una mejoría en número de raíces laterales, elongación de tallos, peso fresco y contenido en clorofila en aquellas crecidas con levaduras con alta producción de ácido indolacético. Por ello, concluyeron que el efecto promotor del crecimiento de algunos microorganismos está correlacionado con su capacidad de producir esta auxina (Fu et al., 2016).

Este experimento presenta resultados diferentes para muchas levaduras. En primer lugar, las que promovieron el crecimiento en placas Petri pero no en placas septadas, podría deberse a la difusión de compuestos al medio de cultivo como amonio y otros metabolitos, o al fenómeno de la rizofagia (Lonhienne et al., 2014), por el que la planta absorbe la célula en su interior; en segundo lugar, aquellas que promovieron el crecimiento en ambos experimentos, podría deberse a la producción de compuestos volátiles; por último, las levaduras que promovieron el crecimiento en placas septadas pero no en placas petri, puede deberse al análisis estadístico realizado con pocas repeticiones.

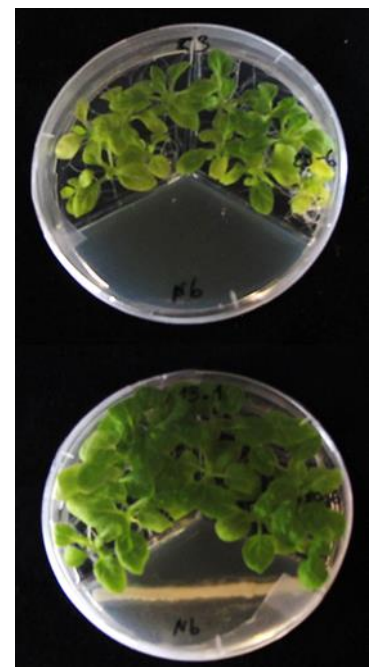


Figura 9: placa septada de *Nicotiana benthamiana* control (superior) y con la levadura 13 (inferior).

5.2. Efecto de levaduras vivas en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate en cultivo en invernadero

El crecimiento de las plantas de tomate en invernadero se observó tanto en altura como en anchura, tomando datos relativos a la longitud de la planta desde los cotiledones hasta el ápice con una cinta métrica, y de grosor del tallo con un calibre. Se observó que, en la mayoría de los casos, el crecimiento medio en altura era superior que el crecimiento medio de las plantas control. Las plantas inoculadas semanalmente con 5×10^3 UFC/ml fueron las de mayor altura respecto al resto de tratamientos, los cuales fueron bastante similares entre sí y con el control (Figura 10.A).

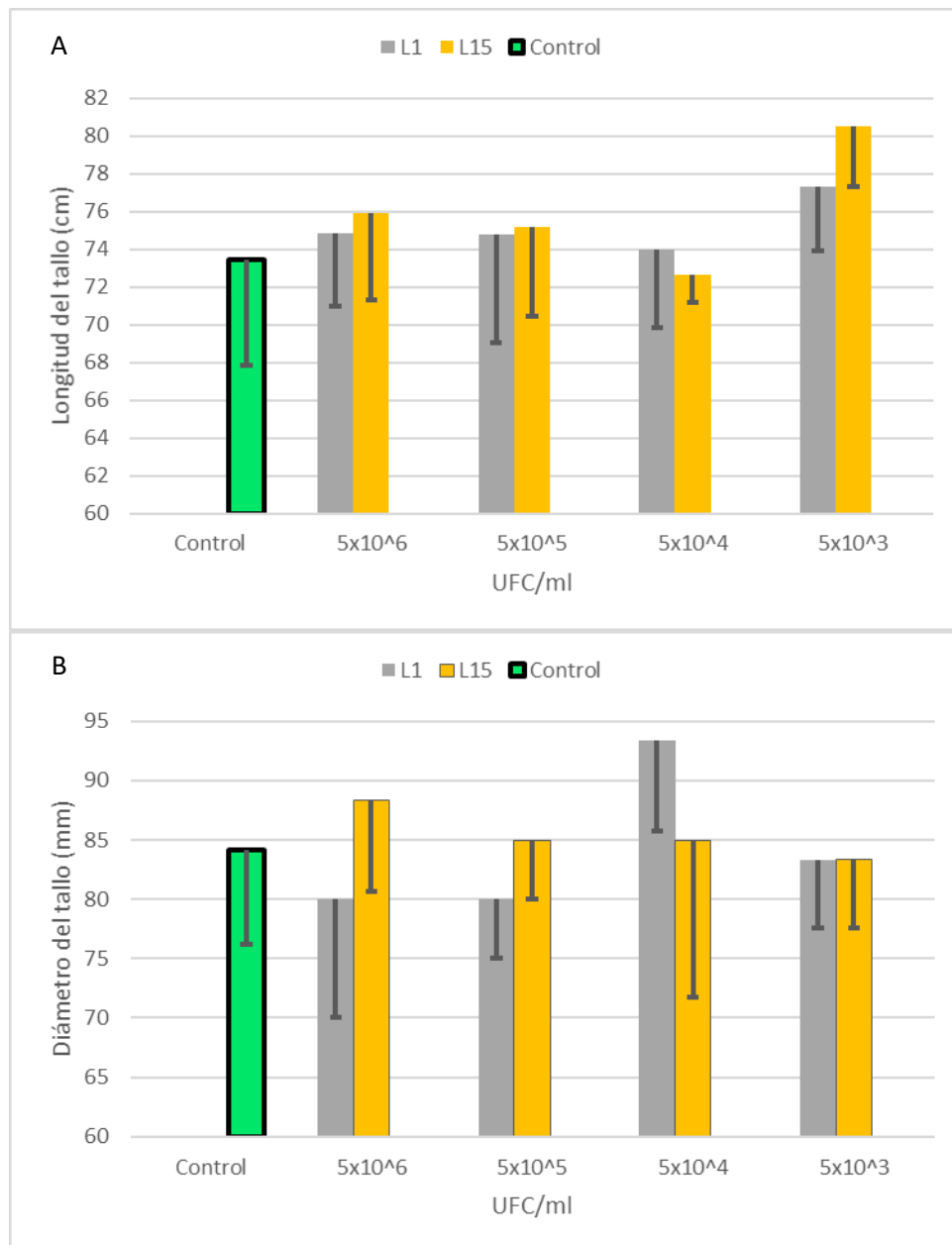


Figura 10: A. Longitud de la planta desde los cotiledones hasta el ápice. B. Diámetro del tallo a la altura de los cotiledones el día 64 tras la germinación. (Tratamientos n=3 muestras. Control N=6 muestras)

En cuanto al calibre del tallo, la levadura 1 dio lugar a tallos con un calibre medio menor que el control, excepto en aquellas que se inocularon con 5×10^4 UFC/ml, que obtuvieron el valor medio más alto del ensayo. La levadura 15 por otra parte, fue más homogénea entre los distintos tratamientos, dando lugar a valores medios muy similares al control, y ligeramente superior el de aquellas inoculadas con 5×10^6 UFC/ml (Figura 10.B).

También se anotaron las fechas de apertura de la primera flor de cada planta, y se hizo una media de los días transcurridos desde la germinación hasta dicha fecha de cada tratamiento. Aunque se obtuvo gran variabilidad en los datos, los tratamientos más adelantados de media fueron la levadura 1 a las dosis de 5×10^4 y 5×10^3 UFC/ml y la levadura 15 a la dosis de 5×10^5 UFC/ml. Las más retrasadas de media fueron la levadura 1 a la dosis de 5×10^5 UFC/ml y la levadura 15 a la dosis de 5×10^3 UFC/ml (Figura 11).

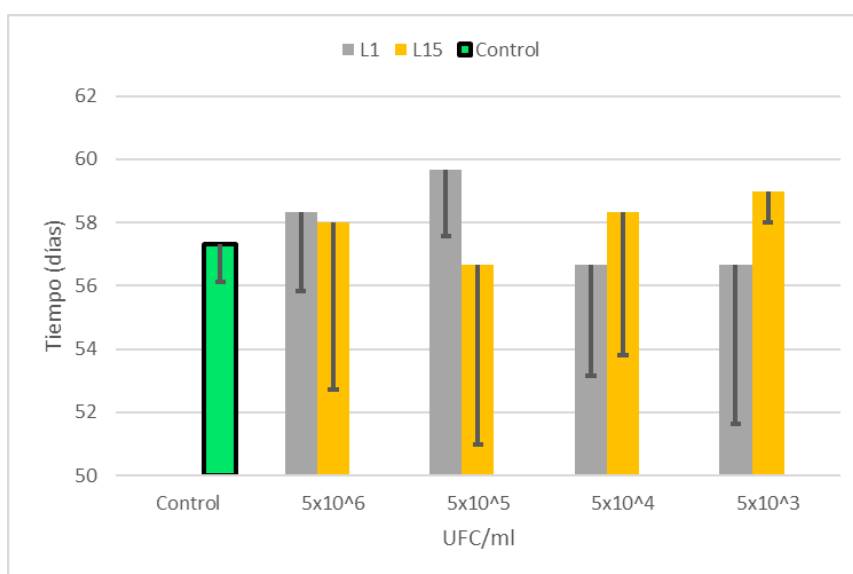


Figura 11: tiempo transcurrido desde la germinación de la planta hasta la apertura de la primera flor (Tratamientos n=3 muestras. Control N=6 muestras)

La dosis de 5×10^6 UFC/ml de la levadura 1 fue el único tratamiento que obtuvo de media una longitud de la hoja mayor superior al control, mientras que el resto de tratamientos obtuvieron valores medios ligeramente inferiores al control. No obstante, el análisis estadístico descartó diferencias significativas en todos los casos. Comparando ambas levaduras entre sí, la levadura 1 es notablemente superior que la 15 en la dosis más concentrada, mientras que en el resto de dosis son bastante similares (Figura 12.A).

La dosis de 5×10^5 UFC/ml fue la que mayor número de hojas por planta obtuvo, en ambas levaduras y con un valor muy similar entre sí. Las dosis de 5×10^6 y 5×10^4 UFC/ml obtuvieron en ambos casos menor número de hojas por planta que el control, y valores muy similares entre sí. La dosis menos concentrada de 5×10^3 UFC/ml obtuvo un número medio de hojas por planta ligeramente superior al control en el caso de la levadura 1, e inferior en la levadura 15 (Figura 12.B).

En cuanto al número de ramas de flor, solo la dosis de 5×10^5 UFC/ml de la levadura 15, y la dosis de 5×10^3 UFC/ml de la levadura 1 obtuvieron resultados medios superiores al control. El resto de tratamientos fueron similares al control (Figura 12.C)

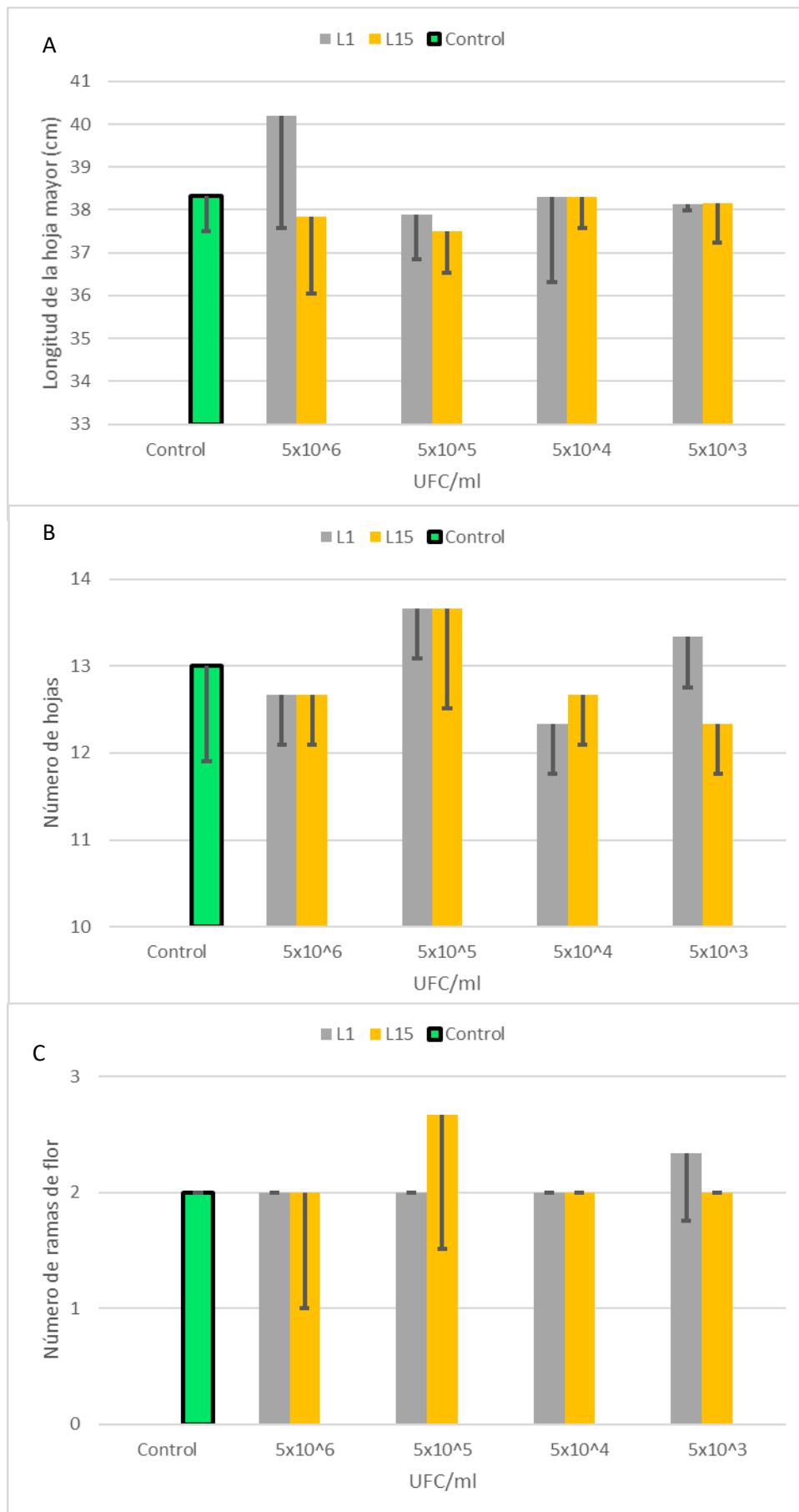


Figura 12: A. Longitud de la hoja más larga. B. Número de hojas por planta. C. Número de ramas de flor por planta. Día 64 tras la germinación. (Tratamientos n=3 muestras. Control N=6 muestras)

Se midió también el nivel de clorofila de las plantas con el dispositivo MINOLTA SPAD-502. Podemos observar que las plantas tratadas con la menor concentración de levaduras, 5×10^3 UFC/ml, obtuvieron un valor medio superior que las plantas control y que el resto de tratamientos. La levadura 15 aplicada a una concentración de 5×10^4 UFC/ml dio valores Spad similares que las plantas control, mientras que el resto de tratamientos dieron valores medios inferiores que el control (Figura 13).

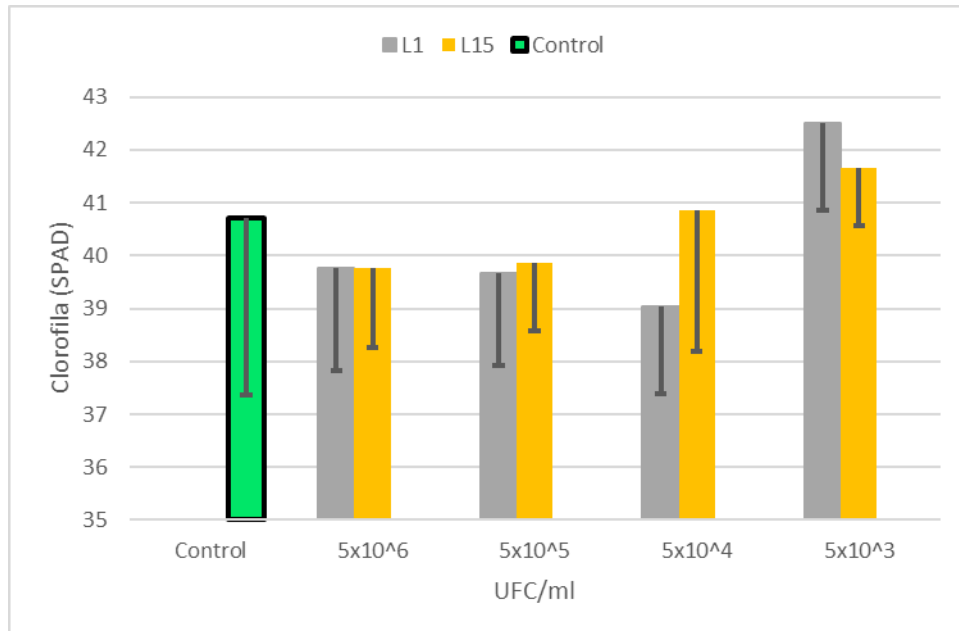


Figura 13: nivel de clorofila medio de las plantas de cada tratamiento el día 64 tras la germinación (Tratamientos n=3 muestras. Control N=6 muestras)

Al finalizar el ensayo, para saber si las levaduras aplicadas durante el mismo habían colonizado el sustrato y/o las raíces, se hicieron aislamientos a diferentes diluciones de ambos entornos en placas con medios de cultivo selectivos. Como se puede observar, en ambos casos se detectó la presencia de las levaduras. La levadura 1 se halló en mayor concentración en el sustrato, mientras que la 15 se halló con mayor frecuencia y concentración en la rizosfera (Figura 14).

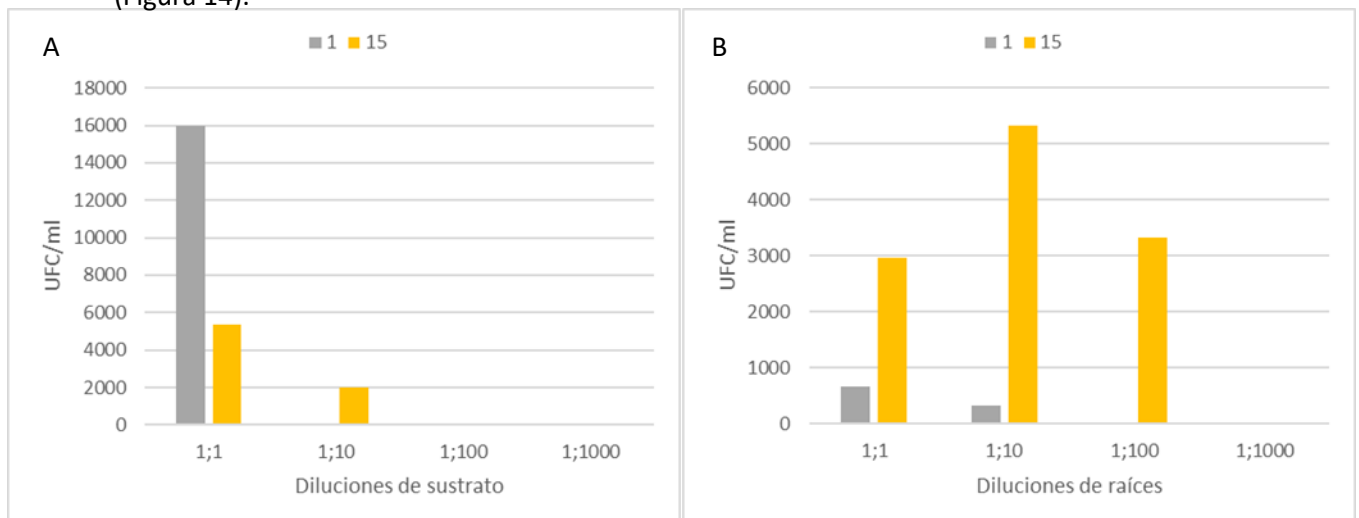


Figura 14: levaduras 1 y 15 detectadas en aislamientos de sustrato (A) y de la rizosfera de las plantas (B), el día 64 del ensayo. (N=3 muestras)

Los resultados de peso fresco fueron de media inferiores los tratamientos a los controles, a excepción de la levadura 1 a las dosis de 5×10^6 y 5×10^3 UFC/ml, en cuyos casos se obtuvo un peso medio ligeramente superior al control. Las otras concentraciones de tratamiento fueron inferiores al control en ambos casos, y de igual valor medio entre sí (Figura 15.A). En cuanto al peso seco los resultados fueron también inferiores los tratamientos a los controles en general, exceptuando la levadura 1 a la dosis de 5×10^6 UFC/ml (Figura 15.B). A igual dosis de aplicación de las levaduras, la levadura 1 dio un valor superior al de la levadura 15 en todos los casos, tanto en peso fresco como en peso seco (Figura 15).

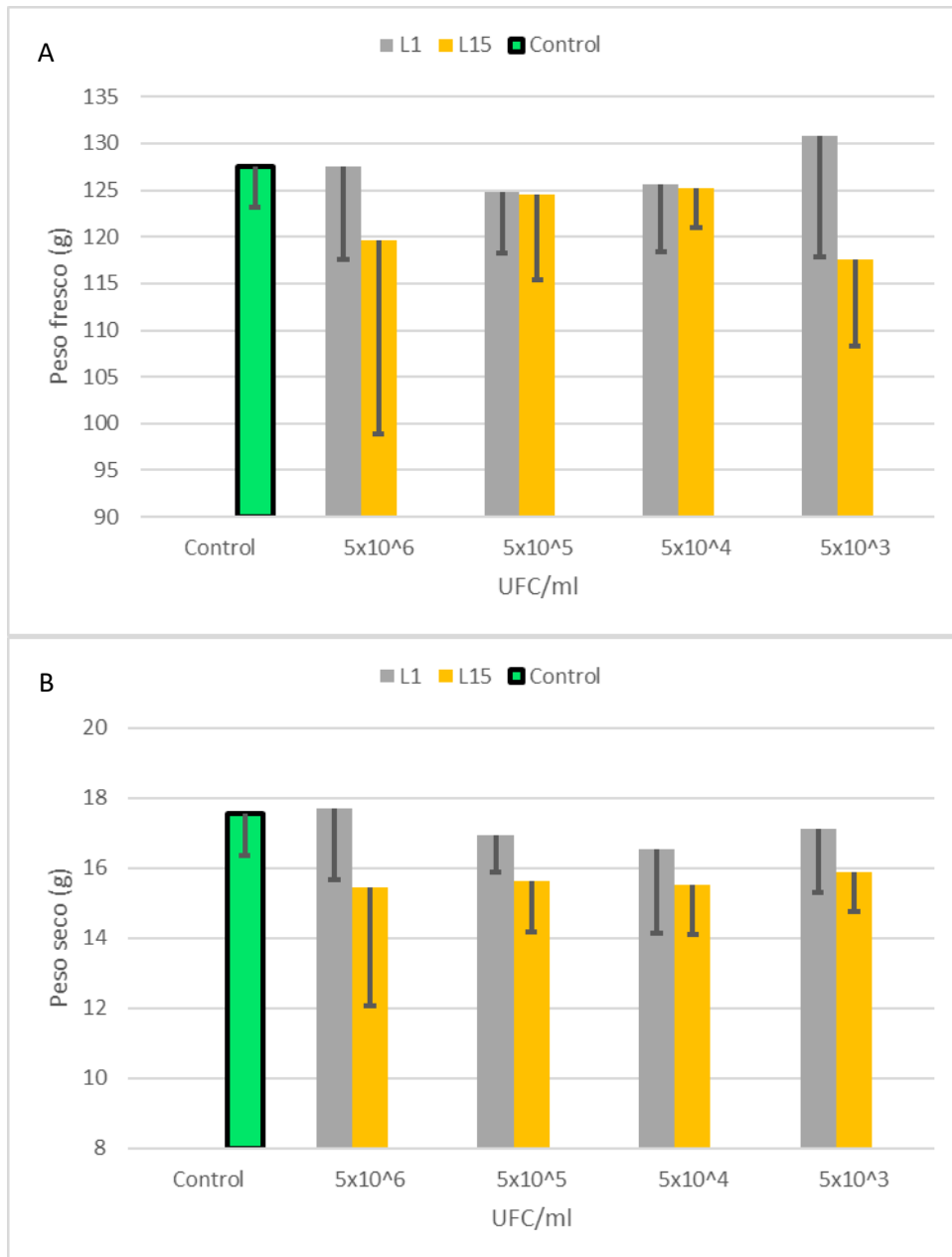


Figura 15: A. Peso fresco de la parte aérea el día 64 tras la germinación. B. Peso seco de la parte aérea el día 64 tras la germinación, y tras 3 días a 60°C . (Tratamientos $n=3$ muestras. Control $N=6$ muestras).

De todos los datos recopilados durante el ensayo, en ningún caso se encontraron diferencias significativas, debido a la gran variabilidad de los mismos. Además, tampoco se encontraron correlaciones entre las dosis aplicadas y el efecto, ni tampoco diferencias similares en los ensayos entre ambas levaduras que pudieran establecer cuál de ellas podría tener un mayor potencial bioestimulante.

Además de los mecanismos de promoción del crecimiento descritos anteriormente, este ensayo se comparó también con otro trabajo anterior de Lonhienne en 2014, en el que aplicó levaduras vivas en plantas de caña de azúcar y tomate, y obtuvo incrementos del 56% y del 47% de peso respectivamente. La observación al microscopio y la expresión de las levaduras de un gen fluorescente indicó que la planta absorbía las células vivas de levaduras directamente al interior de sus células radicales, en un fenómeno conocido como rizofagia (Lonhienne et al., 2014). Este fenómeno fue también observado en 2010 en tomate (*Solanum lycopersicum*) y *Arabidopsis thaliana*, con la bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Paungfoo-Lonhienne et al., 2010). También se demostró que las plantas pueden asimilar las proteínas como fuente de nitrógeno (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008), lo que en este experimento podría haberse producido, aprovechando las células muertas de las levaduras en el sustrato.

En otros ensayos anteriores, se logró obtener mayor peso fresco y peso seco de parte aérea y parte radicular, mayor longitud de brotes y mayor altura de tallo en plantas de maíz, con la aplicación de 5 levaduras diferentes individualmente en invernadero (El-Mehalowy et al., 2004); también en maíz se obtuvo mayor peso seco de parte aérea y radicular, y mayor altura de tallo con la aplicación de la levadura *Williopsis saturnus* en invernadero, en este caso debido a la producción de ácido indolacético (Nassar et al., 2005); en remolacha azucarera se obtuvo mayor peso fresco de la parte aérea y radicular en invernadero con tres levaduras aplicadas individualmente o en combinación, obteniendo además que las combinaciones daban resultados superiores que las levaduras individuales (El-Tarabily, 2004).

5.3. Efecto de levaduras vivas en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate en cultivo hidropónico

Durante el ensayo, se observó que las plantas tratadas con las levaduras seguían, por lo general, un desarrollo similar o ligeramente menor en altura que las plantas Control. Al finalizar el mismo, se volvió a medir la altura de la planta desde los cotiledones hasta el ápice y tras tratar los datos, se observó que solo la media de las plantas tratadas con las levaduras L1 y L27 era mayor que la de las plantas Control. No obstante, tras realizar las pruebas de t de Student, solo se encontraron diferencias significativas frente a las plantas control en las plantas tratadas con las levaduras L16 y L26, ambas de valor inferior al Control. El tratamiento L22 presentó un valor bastante bajo, pero la variabilidad entre plantas del mismo tratamiento era importante como para que la diferencia fuera significativa (Figura 16).

Cabe destacar que la levadura L26 se introdujo en el ensayo como un control negativo, sabiendo que en otros ensayos anteriores había producido un efecto negativo en el crecimiento y el vigor de las plantas.

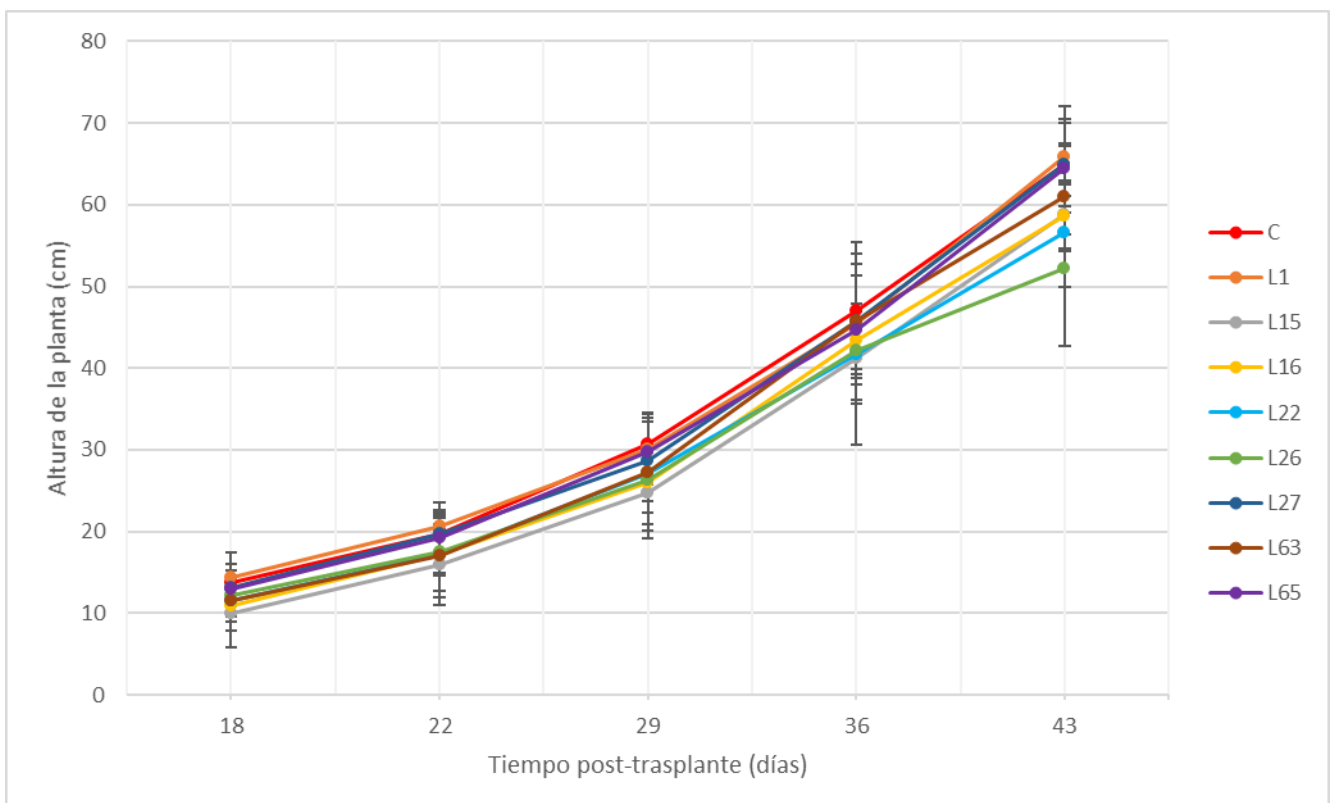


Figura 16: evolución de la altura de las plantas a lo largo del tiempo (Tratamientos n=4 muestras. Control N=8 muestras.)

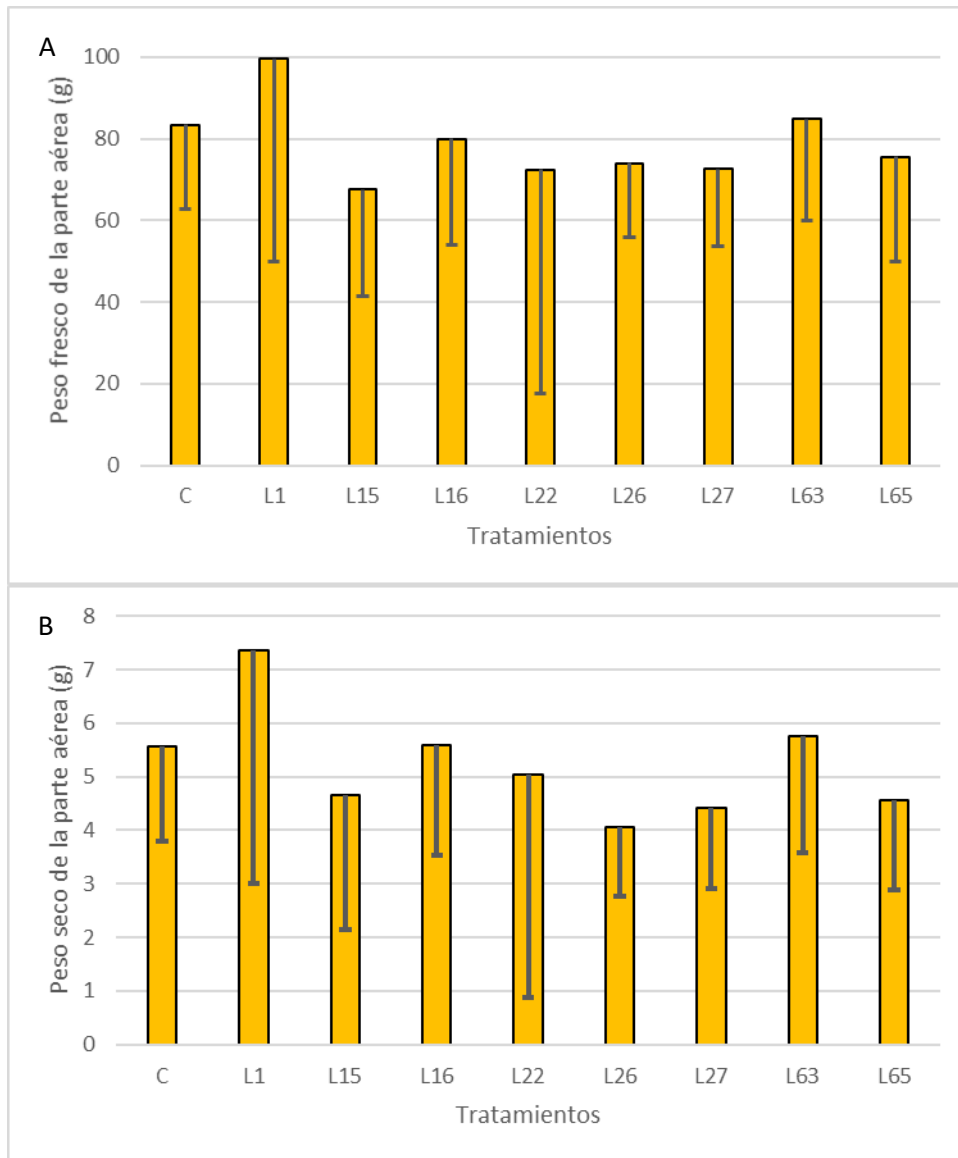


Figura 17: Peso de la parte aérea al final del ensayo (Tratamientos n=4 muestras, Control N=8 muestras)

Al finalizar el ensayo, se cortó la parte aérea a la altura de los cotiledones y se pesó (peso fresco). A continuación, se dejó secar en una estufa a 60°C durante 3 días para que perdiera todo el contenido hídrico, y se volvió a pesar (peso seco). Los datos de peso fresco y peso seco de cada tratamiento mantuvieron la misma diferencia entre sí, lo que parece indicar que todos mantenían un mismo nivel de hidratación (Figura 17).

Según los datos obtenidos de peso fresco, la levadura L1 obtuvo un peso medio notablemente superior que el control, no obstante, tras realizar el tratamiento estadístico se concluyó que dicha diferencia no era significativa, debido probablemente a la alta variabilidad encontrada en los datos del tratamiento L1. El tratamiento L63 también obtuvo un peso fresco medio ligeramente superior que el control, pero sin ser una diferencia significativa. El resto de tratamientos obtuvieron datos de peso fresco medio inferiores al control, y en ninguno de estos casos se encontraron diferencias significativas (Figura 17).

En cuanto a la parte radicular, la longitud fue bastante similar en todos los tratamientos, un poco superior que el control en los tratamientos L1, L16, L22, L27 y L65, pero en ningún caso significativa. En los datos de peso, tanto peso fresco como peso seco, se obtuvo mucha variabilidad, por lo que no se encontraron diferencias significativas. Tan solo el tratamiento L1 obtuvo un peso fresco y peso seco superior al control, mientras que el tratamiento L15 fue el que obtuvo el menor valor medio tanto de peso fresco como de peso seco de la parte radicular (Figura 19).

De las diluciones realizadas a partir de las raíces de las plantas, se hicieron cultivos en medio de cultivo para conocer las poblaciones microbianas de la rizosfera. En dichas placas se buscaron las levaduras tratadas de forma visual, se realizó el conteo y se extrapoló a unidades formadoras de colonia (ufc) por cada mililitro de disolución 1:1. En este caso se calculó el valor promedio de cada tratamiento, y no se realizaron más análisis estadísticos debido a que esto tan solo nos servía para demostrar la presencia de las levaduras tratadas en la rizosfera de las plantas. En este caso, obtenemos un resultado positivo en todos los tratamientos (Figura 18). En los controles no se encontró presencia de las levaduras aplicadas en los demás tratamientos, de modo que se descarta una contaminación cruzada.

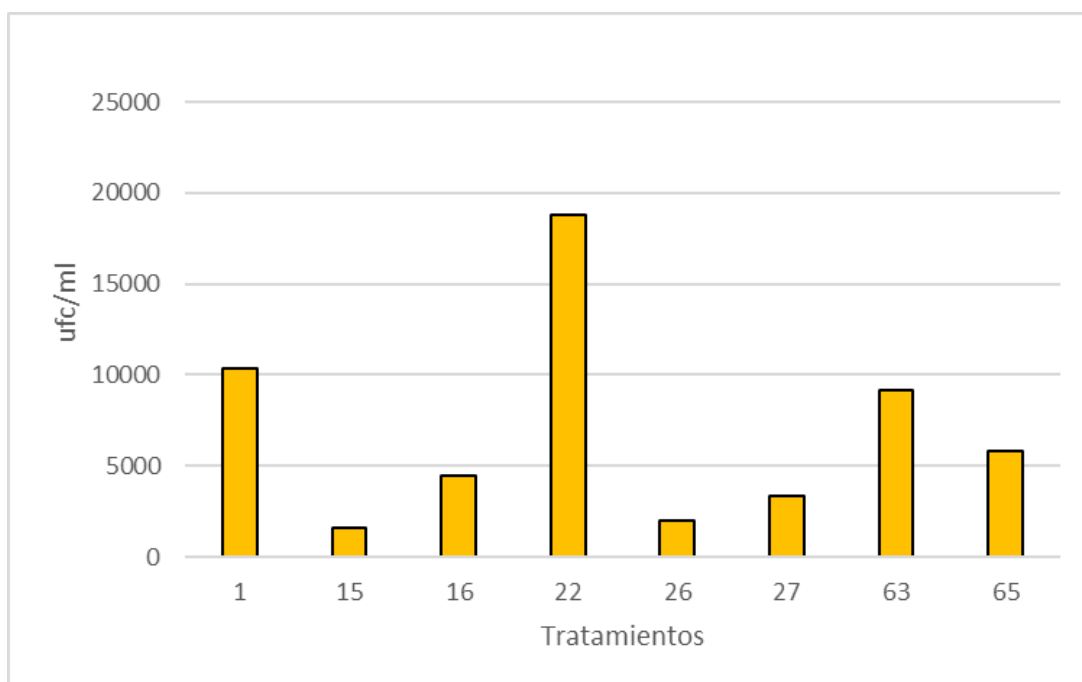


Figura 18: Unidades formadoras de colonias de las levaduras tratadas, por mililitro de disolución preparada a partir de las raíces de cada tratamiento al final del ensayo (N=3 muestras).

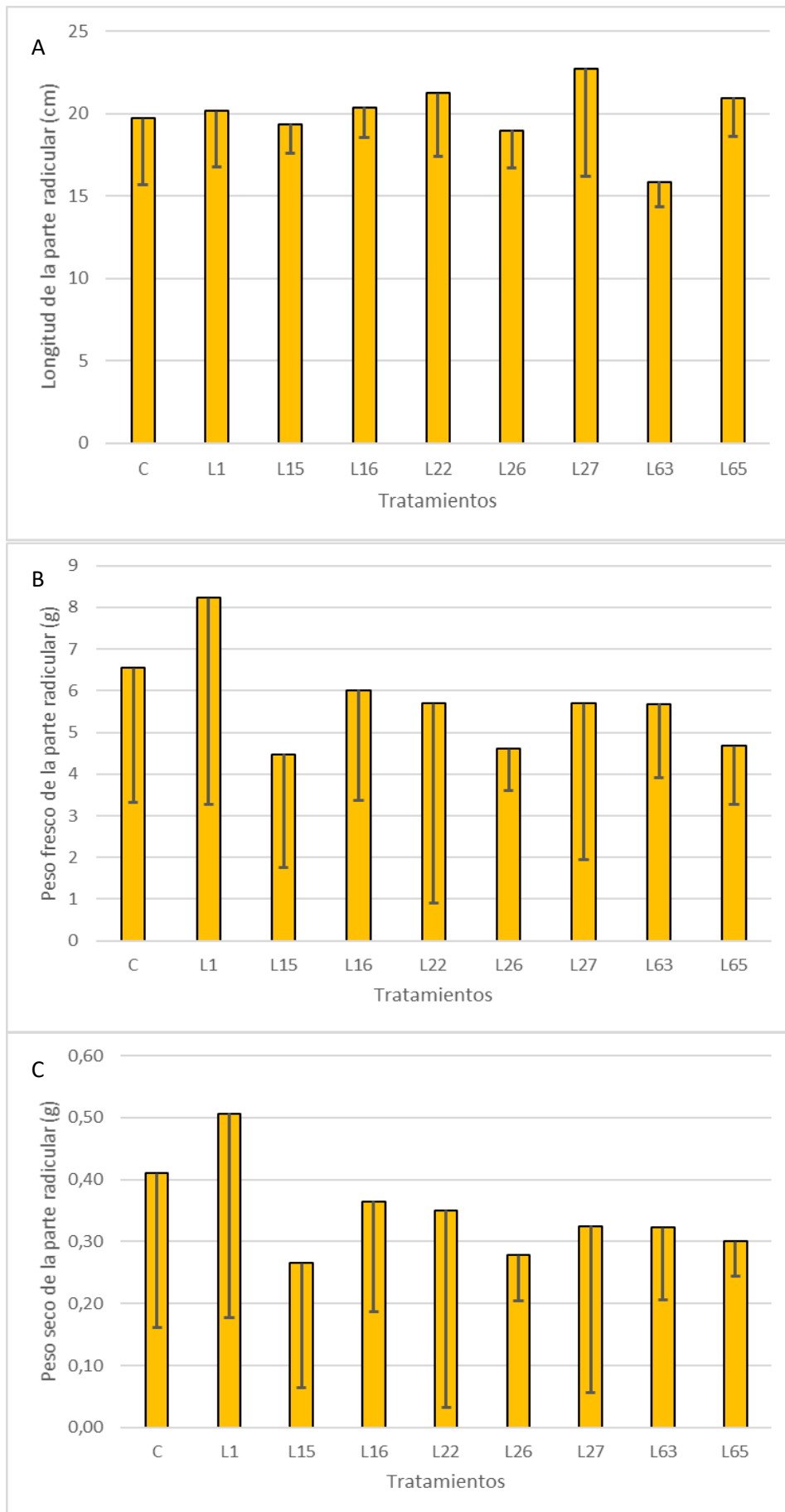


Figura 19: Datos de peso y longitud de la parte radicular al finalizar el ensayo (Tratamientos n=4 muestras, Control N=8 muestras)

Al igual que el ensayo de invernadero, estos resultados no se corresponden con los obtenidos por Lonhienne anteriormente, ya que no se han encontrado diferencias significativas mientras que en el experimento de 2014 se consiguió incrementar el peso de la parte radicular notablemente (Lonhienne et al., 2014). También parecen no haber tenido efecto los mecanismos de absorber y asimilar células vivas de las levaduras en el interior de las células radicales (Lonhienne et al., 2014; Paungfoo-Lonhienne et al., 2010) ni de asimilación de proteínas de las células muertas de las levaduras (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008).

Anteriormente se han citado experimentos en los que la aplicación de levaduras en cultivos in vivo han estimulado con éxito el crecimiento de plantas de maíz y remolacha azucarera (El-Mehallowy et al, 2004; El-Tarabily, 2004; Nassar et al, 2005). No obstante, no se corresponden con los datos obtenidos en el presente experimento in vivo con plantas de tomate. Es posible que se deba a que diferentes especies de microorganismos fueron empleadas, o a diferencias en los métodos, ya que en algunos casos la inoculación de las levaduras se hacía directamente en la semilla desinfectada.

Para futuros ensayos, sería conveniente aumentar la dosis de levaduras aplicadas en ensayos in vivo, tanto en aquellos realizados en invernadero como en los realizados en cultivo hidropónico.

5.4. Interacción hongo-levadura *in vitro*

La interacción de los tres hongos ensayados con las levaduras se estudió midiendo el crecimiento del micelio, y se presentó la diferencia de crecimiento respecto al control como un porcentaje del mismo. Algunas levaduras no pudieron ser estudiadas debido a contaminaciones producidas durante el ensayo.

Tras reunir los datos y realizar el tratamiento estadístico de T de Student al 95%, podemos observar que con *Fusarium oxysporum*, un total de 10 levaduras ha reducido significativamente el crecimiento del micelio del hongo en cultivo *in vitro*. Destaca la levadura 6 por ser la más efectiva, con un porcentaje de reducción del 23,26 % (ver Figura 22).

Por otra parte, el ensayo con *Botrytis cinerea* presenta un total de 9 levaduras que han reducido de forma significativa el crecimiento del micelio. La levadura 20 ha resultado ser en este caso la más efectiva, reduciendo en un 16,66 % el crecimiento del micelio. Conviene destacar que este ensayo presentó una mayor variabilidad que los otros dos ensayos de hongos, debido al crecimiento irregular de la cepa de *Botrytis cinerea* (ver Figuras 20 y 23).

Verticillium dahliae resultó ser el hongo más sensible de los tres a los efectos antagónicos de las levaduras, ya que un total de 45 de las 70 levaduras redujeron significativamente su crecimiento, y además los valores de reducción fueron superiores en este ensayo, ya que la media de reducción del crecimiento de las levaduras significativas fue del 26,35 %, y los valores superiores fueron obtenidos con las levaduras 54 (53,76 %), 67 (36,99 %), 29 (35,42 %), 66 (34,31 %), 65 (33,78 %), 14 (33,76 %) y 37 (33,31 %) (ver Figuras 21 y 24).

De entre todas las levaduras, tan solo la 32 produjo una reducción significativa en las tres cepas de hongos fitopatógenos, siendo más efectiva en *Verticillium dahliae* (25,85 %) frente a *Fusarium oxysporum* (15,23 %) y *Botrytis cinerea* (9,53 %). Las levaduras 6, 24, 54 y 61 redujeron el crecimiento tanto en *Fusarium oxysporum* como en *Verticillium dahliae*; y las levaduras 2, 25, 30, 37 y 39 redujeron el crecimiento tanto en *Botrytis cinerea* como en *Verticillium dahliae*.



Figura 20: placas con *Botrytis cinerea* control (derecha) y cultivado con la levadura 20 (izquierda), de la primera repetición y el día 23 del ensayo.

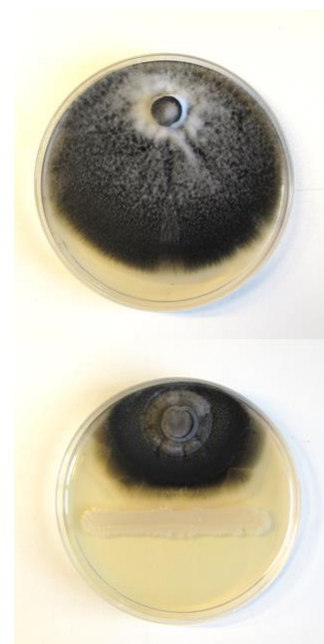


Figura 21: placas con *Verticillium dahliae* control (superior) y cultivado con la levadura 7 (inferior), de la cuarta repetición y el día 30 del ensayo.

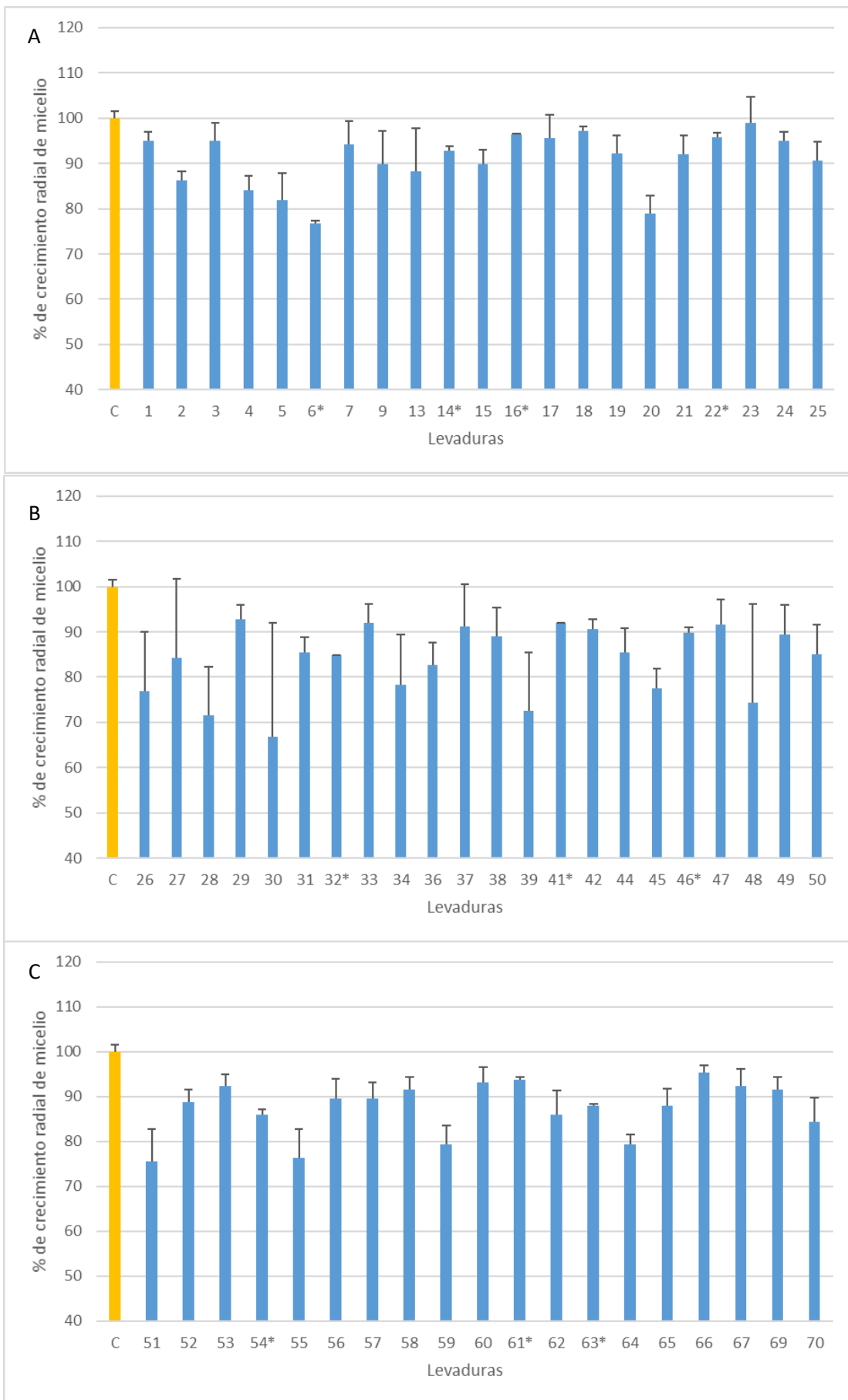


Figura 22: A. . Crecimiento radial del micelio del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en presencia de las levaduras 1-25 en medio PDA. B. Levaduras 26-50. C. Levaduras 51-70. (Tratamientos n=2 muestras. Control n=9 muestras)

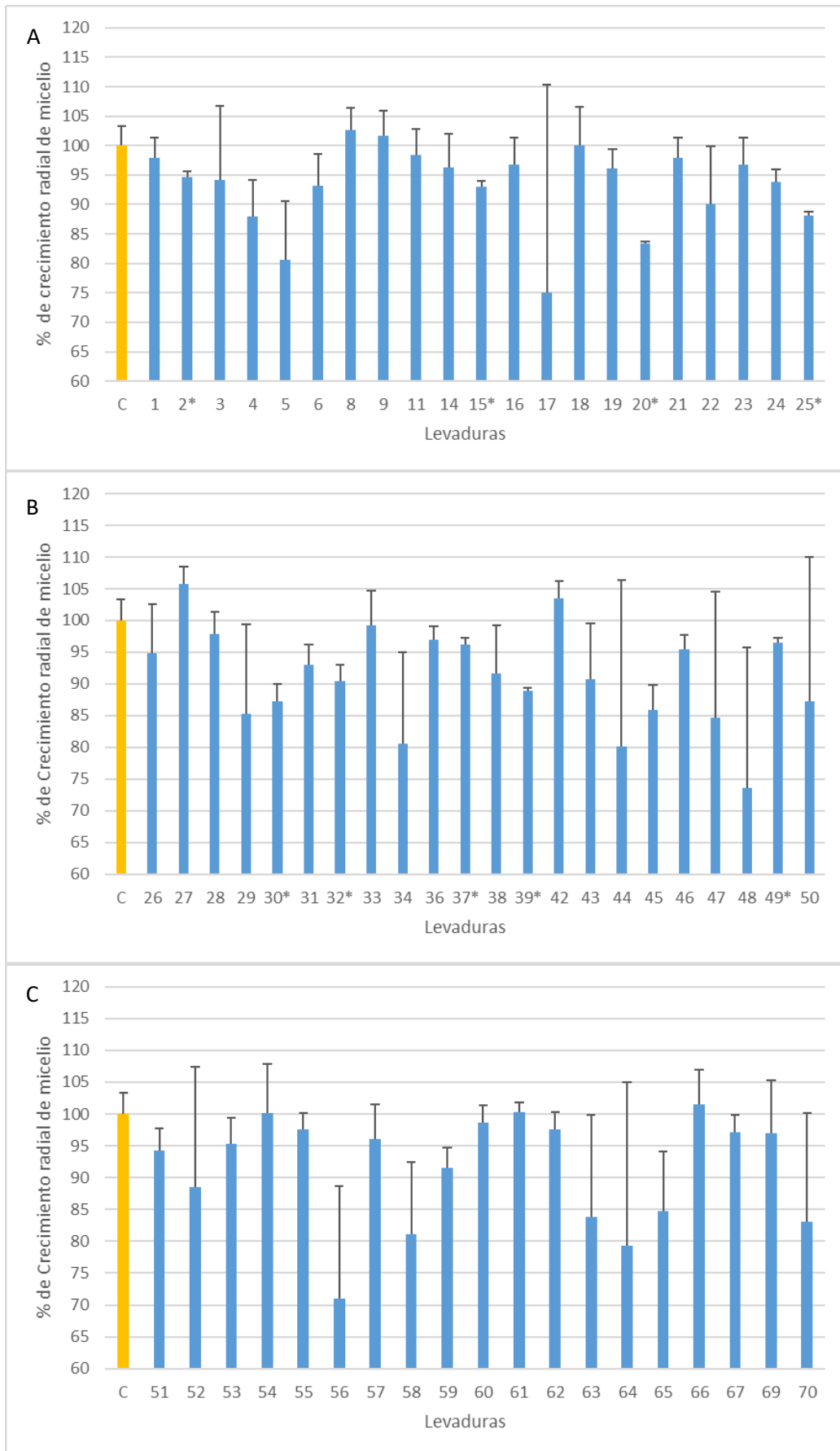


Figura 23: A. . Crecimiento radial del micelio del hongo fitopatogéno *Botrytis cinerea* en presencia de las levaduras 1-25 en medio PDA. B. Levaduras 26-50. C. Levaduras 51-70. (Tratamientos n=3 muestras. Control n=11 muestras)

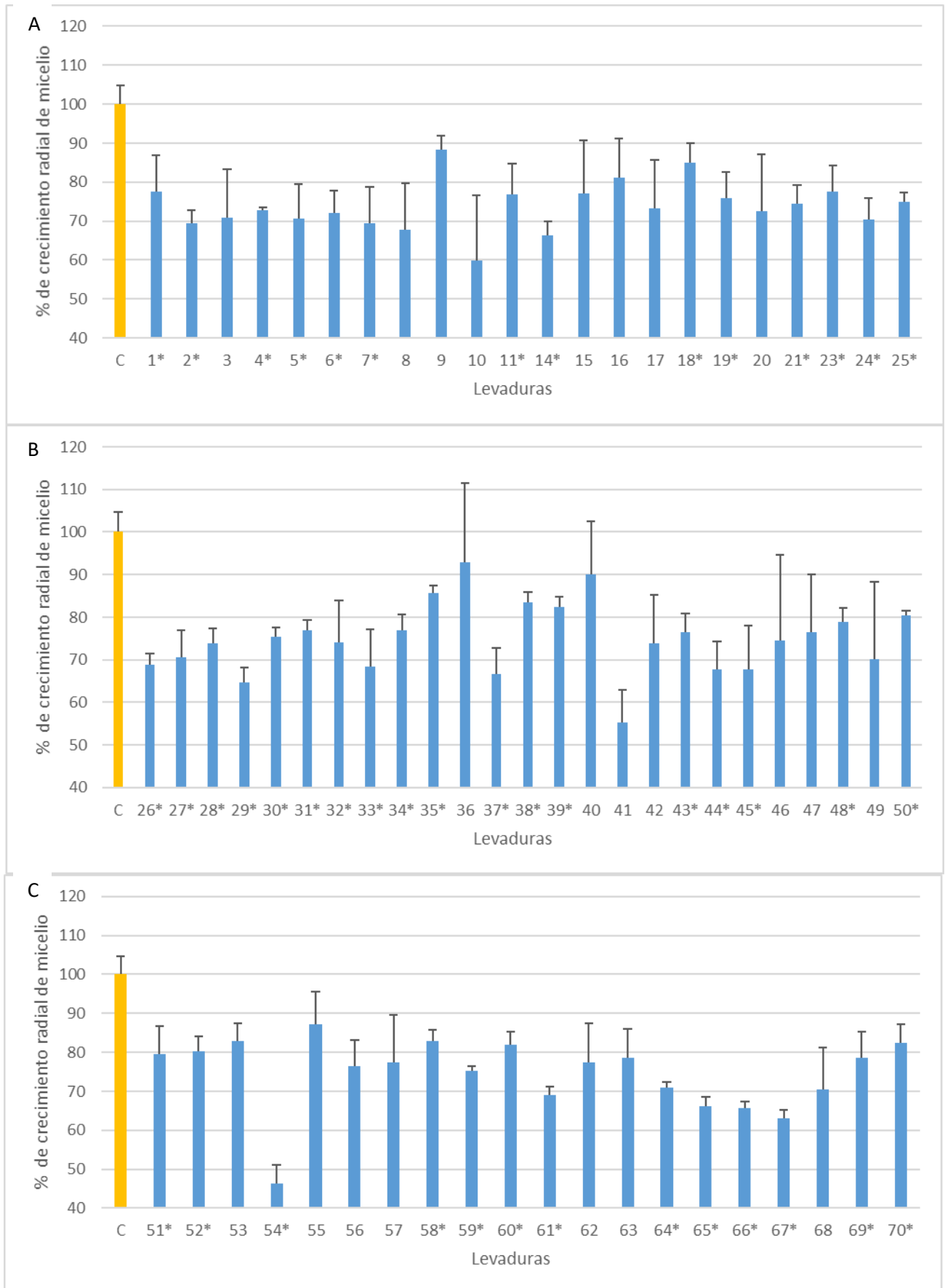


Figura 24: A. Crecimiento radial del micelio del hongo fitopatogéno *Verticillium dahliae* en presencia de las levaduras 1-25 en medio PDA. B. Levaduras 26-50. C. Levaduras 51-70. (Tratamientos n=3 muestras. Control n=10 muestras)

Para conocer qué posibles mecanismos de antagonismo pueden haber tenido lugar en estas interacciones, se hará un breve repaso a lo observado hasta ahora en estudios anteriores.

Los mecanismos de antagonismo de levaduras con hongos han sido estudiados sobre todo en partes aéreas (hojas y frutos), pero son similares en suelo y en residuos de cosecha (El-Tarabily. et al., 2006). Fundamentalmente son los siguientes: competencia por nutrientes y espacio, producción de compuestos antagónicos volátiles o difusibles y producción de enzimas degradantes de la pared celular.

En el experimento actual, no se realizó ninguna observación adicional para comprobar o descartar qué mecanismos han podido ser los causantes de los antagonismos, por lo que podría ser cualquiera de ellos. La competencia por nutrientes y espacio tal vez sea el más estudiado hasta la fecha (Fokkema, 1984; Droby, 1989; Filonow 1998; Janisiewicz et al. 2000). Este mecanismo puede ser más relevante en el entorno frutícola, ya que la presencia de exudados de azúcar en la superficie de las frutas es una fuente de nutrientes para ambos organismos, levadura y hongo (El-Tarabily, 2004). Está comprobado que las levaduras asimilan los nutrientes de forma más rápida que los hongos (Brodie & Blakeman 1976; Blakeman & Brodie 1977; Fokkema 1981), de modo que una dosis alta de levaduras puede agotar los nutrientes rápidamente, reduciendo la disponibilidad de éstos para el hongo (Payne & Bruce, 2001). Un mecanismo muy unido a este pero menos estudiado, es la producción de sideróforos, que son compuestos quelantes del hierro, que reducen la disponibilidad de este nutriente para los patógenos, pudiendo condicionar el crecimiento del hongo (Neubauer et al, 2000; Verma et al, 2011; Fu et al., 2016). En un estudio más reciente, la levadura *Torulaspota globosa* se cultivó in vitro e in vivo con el hongo *Colletotrichum sublineolum*, causante de la antracnosis en sorgo, y se analizó actividad antibiótica, producción de sideróforos, compuestos volátiles y enzimas hidrolíticas. La levadura no produjo sideróforos, compuestos volátiles o enzimas degradantes de pared celular, pero redujo el crecimiento del micelio in vitro y controló la enfermedad en sorgo in vivo. El hecho de que estos resultados se obtuvieran tanto aplicando la levadura antes como después de las esporas fúngicas, sugiere la competencia y la actividad antifúngica combinadas como los mecanismos (Rosa et al., 2010). Dicho esto, también es conveniente señalar que una misma levadura puede inhibir el crecimiento de un hongo por varios métodos a la vez.

Es posible que la competencia haya sido el mecanismo de antagonismo en varias levaduras del presente ensayo, al igual que en experimentos anteriores (Spadaro et al, 2002; Fu et al., 2016; Nutaratat et al, 2014; Rosa et al., 2010). Por ejemplo, Spadaro inhibió completamente la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* en cocultivo in vitro en medio sintético con la levadura *Metschnikowia pulcherrima*, cosa que no ocurrió con suspensiones filtradas y autoclavadas de la levadura. Esto sugiere que se necesitan células vivas para ese caso de biocontrol, y ya que esta levadura no produce compuestos antibióticos in vitro, se asume el mecanismo de competencia como el que ha actuado (Spadaro et al, 2002).

Otro mecanismo de antagonismo estudiado en experimentos anteriores es la producción de metabolitos antifúngicos, o antibiosis (Walker et al., 1995; Masih et al., 2001; Höfte et al., 2004; Nutaratat et al, 2014; Rosa et al, 2010). En el ensayo de Suzzi, levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* inhibieron el crecimiento in vitro de los hongos

fitopatógenos *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotium* y *Macrophomia phaseolina* (Suzzi et al. 1995).

Walker et al. (1995) destacó el potencial de las levaduras que producen estos compuestos, al inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* o *Fusarium equiseti*. El-Tarabily también redujo el crecimiento de hongos y mohos in vitro con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces spp* mediante la liberación de compuestos antifúngicos volátiles.

En el presente experimento, como se ha dicho anteriormente, no se han realizado pruebas adicionales que permitan diferenciar los modos de acción. La observación al microscopio de las hifas de los hongos podría haber indicado la liberación de compuestos antifúngicos por parte de las levaduras, en caso de que las células estuvieran dañadas, lo que distinguiría cuáles actúan de esta forma y cuales por otros modos como la competencia. Además, de haberse realizado a continuación de la observación al microscopio, un ensayo similar con placas septadas, separando en medios diferentes de la misma placa la levadura y el hongo, se podría observar cuáles de las levaduras liberan compuestos difusibles al medio y cuáles liberan compuestos volátiles al ambiente.

Un mecanismo muy similar al anterior es la producción de enzimas degradantes de la pared celular, como la beta-1,3-glucanasa y quitinasa. Se ha observado la adhesión de células de levaduras vivas a las hifas de hongos patógenos en anteriores trabajos (Wisniewski et al. 1991; Cook et al. 1997; Arras et al. 1998; Castoria et al., 2001; Spadaro et al., 2002; Fu et al., 2016), lo que sugiere un reconocimiento e interacción entre la levadura y los hongos (Khaled A. El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). El-Ghaouth observó que la levadura *Candida saitoana* producía lesiones citológicas severas en las hifas del hongo *Botrytis cinerea*, tales como perforación de la pared celular y degradación del protoplasma (El-Ghaouth et al, 1998).

Al igual que el anterior mecanismo, se podrían haber realizado observaciones al microscopio de las hifas de los hongos en el presente experimento, para determinar esta interacción con las levaduras. Para futuros ensayos, sería interesante seleccionar las levaduras que mayor efectividad han mostrado en la inhibición del crecimiento de hongos, y repetir el ensayo con más repeticiones.

6. Conclusiones

- Se ha observado un efecto promotor del crecimiento de muchas de las levaduras ensayadas in vitro con *Nicotiana benthamiana*
- Los resultados positivos del ensayo in vitro no se han obtenido en los ensayos in vivo con tomate, en cultivo hidropónico o en invernadero, posiblemente debido a una dosis aplicada insuficiente en éstos últimos
- Se ha demostrado el efecto inhibidor del crecimiento que poseen algunas de las levaduras en los hongos ensayados
- El hongo más susceptible a la inhibición ha sido *Verticillium dahliae*, con un total de 45 levaduras que inhibieron su crecimiento, frente a 10 levaduras en *Fusarium oxysporum* y 9 levaduras en *Botrytis cinerea*.
- Tan solo una levadura del total de 70 de la colección tuvo un efecto inhibidor en los tres hongos (levadura 32).

7. Bibliografía

- Abhilash, P. C., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in biotechnology*, 34(11), 847-850.
- Abhilash, P. C., Powell, J. R., Singh, H. B., & Singh, B. K. (2012). Plant–microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. *Trends in biotechnology*, 30(8), 416-420.
- Arras, G., De Cicco, V., Arru, S., & Lima, G. (1998). Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73 (3), 413–418. <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11510993>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Blakeman, J. P., & Brodie, I. D. S. (1977). Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology*, 10(1), 29–42. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(77\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0048-4059(77)90005-4)
- Brodie, I., and Blakeman, J. (1976). Competition for exogenous substances in vitro by leaf surface microorganisms and germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* 9,227–239.
- Cakmak, I. (2002). Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant Soil* 247, 3–24
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S., & De Cicco, V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: Study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22(1), 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00186-1)
- Cook DWM, Long PG, Ganesh S, Cheah LH (1997). Attachment microbes antagonistic against *Botrytis cinerea*: biological control and scanning electron microscope studies in vivo. *Ann Appl Biol*131:503–518
- Cordell, D., Drangert, J.-O. & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305
- Correl DL. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters. *J. Environ. Qual.* 27:261–66
- Dawson, C.J. & Hilton, J. (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36, S14–S22
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. (1989). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&site=eds-live&db=edsagr&AN=edsagr.US201302659254>
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1998). Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in Apple Fruit. *Phytopathology*, 88, 282–291. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.4.282>

- El-Mehalow, a a, Hassanein, N. M., Khater, H. M., Daram El-Din, E. a, & Youssef, Y. a. (2004). Influence of maize root colonization by rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Inter. J. Agric. Biol.*, 6(i), 599–605. <https://doi.org/1560-8530/2004/06-4-599-605>
- El-Tarabily, K. A. (2004). Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 69–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02043.x>
- El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47(1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>
- Evans, H.J. & Sorger, G.J. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 17, 47–76
- Food and Agriculture Organisation FAO (2017). El futuro de la alimentación y la agricultura. Tendencias y desafíos
- Filonow, A. B. (1998). Role of Competition for Sugars by Yeasts in the Biocontrol of Gray Mold of Apple. *Biocontrol Science and Technology*, 8(2), 243–256. <https://doi.org/10.1080/09583159830315>
- Fokkema, N. J. (1981). Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental. Microbial ecology of the phylloplane. Academic Press, London, 433-454.
- Fokkema NJ (1984) Competition for endogenous and exogenous nutrients between *Sporobolomyces roseus* and *Cochliobolus sativus*. *Can J Bot* 62:2463–2468
- Fu, S. F., Sun, P. F., Lu, H. Y., Wei, J. Y., Xiao, H. S., Fang, W. T., Chou, J. Y. (2016). Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology*, 120(3), 433–448. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.006>
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., ... & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320(5878), 889-892.
- Gianessi, L.P. & Reigner, N.P. (2007). The value of herbicides in US crop production. *Weed Technol.* 21, 559–566
- Gilbert, N. (2009). The disappearing nutrient. *Nature* 461, 716–718
- Goedert W. L. (1983). Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. *Eur. J. Soil Sci.* 34:405-28
- Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293-296.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237, 173–195
- Höfte M, Poppe L, Druvefors U, Schnürer J, De Cal A, Melgarejo P, Stèpien V, Jijakli MH (2004) Modes of action of *Candida sake* CPA-1, *Pantoea agglomerans* CPA-2, *Epicoccum nigrum* 282 and *Pichia anomala* J121, effective antagonists of postharvest pathogens. In: International Workshop Disease Biocontrol in Food Production: development of biocontrol agents of fungal diseases for commercial applications in food production systems, Seville, Spain, March 24–27, p 27

- Janisiewicz, W. J., Tworkoski, T. J., & Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, *90*(11), 1196–1200. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1196>
- Kirkby E. A., Johnston E. A. (2008). Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition. In *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, ed. PJ White, JP Hammond, pp. 177–223. Dordrecht, Neth.:Springer
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(1), 95–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035949>
- Lonhienne, T., Mason, M. G., Ragan, M. A., Hugenholtz, P., Schmidt, S., & Paungfoo-Lonhienne, C. (2014). Yeast as a biofertilizer alters plant growth and morphology. *Crop Science*, *54*(2), 785–790. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.07.0488>
- Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E. A., Vernet, G., Charpentier, C., ... Paul, B. (2001). Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters*, *202*(2), 227–232. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00323-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00323-8)
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. España. (2017). Definición y evaluación de estrategias de potenciación de la capacidad de interlocución y vertebración del sector de la producción ecológica de España
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2005). Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, *42*(2), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0008-y>
- Neubauer, U. T. A., Nowack, B., & Furrer, G. (2000). Heavy Metal Sorption on Clay Minerals Affected by the Siderophore Desferrioxamine B. *Environmental Science & Technology*, *34*(13), 2749–2755. <https://doi.org/10.1021/es990495w>
- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2014). Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology*, *118*(8), 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.010>
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G. a, Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R. I., Schmidt, S. (2008). Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(11), 4524–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712078105>
- Paungfoo-Lonhienne, C., Rentsch, D., Robatzek, S., Webb, R. I., Sagulenko, E., Näsholm, T., ... Lonhienne, T. G. A. (2010). Turning the table: Plants consume microbes as a source of nutrients. *PLoS ONE*, *5*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011915>
- Payne, C., & Bruce, a. (2001). The yeast *Debaryomyces hansenii* as a short-term biological control agent against fungal spoilage of sawn *Pinus sylvestris* timber. *Biological Control*, *22*(1), 22–28. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0953>
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* *61*, 317–347

- Real Decreto 999/2017, de 6 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado. Madrid, 11 de enero de 2018, núm. 296, pp. 119396-119450.
- Real Decreto 506/2013, de 10 de julio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado. Madrid, 11 de enero de 2018, núm. 164, pp. 51119-51207
- Rosa, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., Rampazzo, P. E., & Ceccato-Antonini, S. R. (2010). Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1491–1502. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0324-8>
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 25-33. Smith VH, Schindler D. W. (2009). Eutrophication science: Where do we go from here? *Trends Ecol. Evol.* 24:201–207
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., & Gullino, M. L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24(2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7)
- Sun, P. F., Fang, W. T., Shin, L. Y., Wei, J. Y., Fu, S. F., & Chou, J. Y. (2014). Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PLoS ONE*, 9(12), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114196>
- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., & Montuschi, C. (1995). Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 304–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05030.x>
- Syers, J.K., Johnston, A.E. & Curtis, D. (2008). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: reconciling changing concepts of soil phosphorus behavior with agronomic information. *Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* 18 (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- Tilman, D. et al. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677
- Tilman, E.A., Tilman, D., Crawley, M.J. & Johnston, A.E. (1999). Biological weed control via nutrient competition: potassium limitation of dandelions. *Ecol. Appl.*, 9, 103–111
- Tripler, C. E., Kaushal, S. S., Likens, G. E., & Todd Walter, M. (2006). Patterns in potassium dynamics in forest ecosystems. *Ecology Letters*, 9(4), 451-466.
- Usall, J., Torres, R., & Teixidó, N. (2016). Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative?. *Current Opinion in Food Science*, 11, 51-55. Vance C. P., Uhde-Stone C., Allan D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157:423–47
- Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology*, 51(5), 550–556. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000155>
- Walker, G. M., Mcleod, A. H., & Hodgson, V. J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127(3), 213–222. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00064-C](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00064-C)

- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(4), 245–258. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90033-E](https://doi.org/10.1016/0885-5765(91)90033-E)
- Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., von Locquenghien, K. H., Pasda, G., ... & Wissemeier, A. (2001). 3, 4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP)—a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biology and fertility of soils*, 34(2), 79-84.