



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**



**Escuela Técnica Superior  
de Ingenierías Agrarias Palencia**

**Grado en Ingeniería Agrícola y del Medio Rural**

**“Aplicación de microorganismos como  
alternativa a fertilizantes de síntesis en cultivos  
extensivos de cereal”**

Alumno: Carlos Calleja Montero

Tutor: Jorge Martín García

Cotutor: Jorge Poveda Arias

Director: Óscar Urrutia Sagardia

SEPTIEMBRE DE 2024



# Índice

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>SITUACIÓN ACTUAL</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>LA CEBADA</b>	<b>5</b>
2.2.1	GENERALIDADES DEL CULTIVO	5
2.2.2	BOTÁNICA Y TAXONOMÍA	5
2.2.3	MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA	6
2.2.4	IMPORTANCIA DEL CULTIVO	7
<b>2.3</b>	<b>LA BIOFERTILIZACIÓN</b>	<b>10</b>
2.3.1	GENERALIDADES	10
2.3.2	MICORRIZAS	10
2.3.3	PGPRS	13
2.3.4	EMEORO MIXQAP	14
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL VEGETAL</b>	<b>16</b>
<b>4.2</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DEL SUELO USADO EN EL TRABAJO</b>	<b>16</b>
<b>4.3</b>	<b>BANDEJAS DE ALVEOLOS</b>	<b>17</b>
4.3.1	TÉCNICAS DE APLICACIÓN	21
4.3.2	ESTRÉS ABIÓTICO	22
<b>4.4</b>	<b>PARCELA DE EXPERIMENTACIÓN DE LA ETSIIAA</b>	<b>23</b>
4.4.1	TÉCNICAS DE APLICACIÓN	26
<b>4.5</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>27</b>
4.5.1	ENSAYO DE MICORRIZACIÓN	27
4.5.2	ENSAYO DE CRECIMIENTO	28
4.5.3	ENSAYO DE PRODUCCIÓN FINAL	29
<b>4.6</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>PRUEBAS DE MICORRIZACIÓN</b>	<b>31</b>
5.1.1	ANÁLISIS DE MICORRIZACIÓN EN BANDEJA DE ALVEOLOS	31
5.1.2	ANÁLISIS DE MICORRIZACIÓN EN PARCELA	32
<b>5.2</b>	<b>PRUEBAS DE CRECIMIENTO</b>	<b>32</b>
5.2.1	ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN BANDEJA DE ALVEOLOS	32
5.2.2	ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN PARCELA	39
<b>5.3</b>	<b>PRUEBAS DE PRODUCCIÓN FINAL</b>	<b>41</b>
5.3.1	ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN FINAL EN BANDEJA DE ALVEOLOS	41
5.3.2	ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN FINAL EN PARCELA	42

<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>50</b>

# 1 RESUMEN

La agricultura es un sector fundamental tanto para la alimentación de la población como para la economía global. Sin embargo, la proyección de aumento de la población mundial a 10.000 millones para 2050 plantea un gran desafío. Se estima que la producción agrícola deberá aumentar en un 70% para satisfacer la demanda alimentaria. Por ello, la preservación de la fertilidad del suelo se convierte en un aspecto crítico para sustentar este crecimiento. La búsqueda de prácticas agrícolas sostenibles ha llevado a un creciente interés en los biofertilizantes, productos que incluyen microorganismos beneficiosos que promueven el crecimiento vegetal. La biofertilización se basa en mejorar la fertilidad del suelo, aportar nutrientes y ayudar a las plantas a tolerar condiciones adversas. Para conseguirlo, una estrategia eficaz es la co-inoculación de micorrizas arbusculares (AMF) y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). Emeoro MixQAP es un biofertilizante que combina micorrizas, PGPR y levaduras para trabajar de manera complementaria, facilitando la comunicación molecular entre las raíces y los hongos, lo que maximiza su eficacia en la mejora de la salud y crecimiento de los cultivos.

La hipótesis de este trabajo de investigación es que la aplicación de Emeoro MixQAP en el cultivo de cebada puede mejorar las condiciones del suelo y el rendimiento del cultivo, gracias a la co-inoculación de *Glomus* spp. y *Bacillus* spp., que favorece la colonización de las raíces y aumenta su capacidad de absorción de nutrientes. Así, el objetivo general es evaluar la viabilidad de Emeoro MixQAP como biofertilizante en cultivos extensivos de cereal. Para alcanzarlo, se proponen dos objetivos específicos: primero, determinar la técnica de aplicación que favorezca el establecimiento de micorrizas y su impacto en el desarrollo y producción de las plantas; y segundo, evaluar el potencial estimulante del biofertilizante frente al estrés hídrico.

Se llevaron a cabo ensayos con cebada (*Hordeum vulgare* var. *distichum* cult. Planet) en condiciones de invernadero (bandeja de alveolos con sustrato comercial) y de campo. Se evaluaron dos técnicas de aplicación del producto: en semilla y planta. Además, se llevó a cabo un ensayo de estrés abiótico en bandejas de alveolos, simulando condiciones de sequía. En ambos experimentos, se evaluó el grado de micorrización y los estados morfológicos y fisiológicos de las plantas en diferentes estadios fenológicos, así como la producción final.

Los resultados mostraron que la aplicación directa sobre semilla favoreció la micorrización, especialmente en el estado fenológico BBCH 23 y 37. La influencia de la humedad y el estrés fue variable, mostrando diferentes resultados según la fase.

En el análisis de crecimiento en bandejas de alveolos, las plantas tratadas con el producto presentaron un retraso en su madurez y variaron en altura, peso radicular y foliar en comparación con las plantas sin tratar. A nivel morfológico y fisiológico, algunos parámetros mostraron valores superiores en plantas tratadas, aunque no se detectaron diferencias significativas.

En la producción final, los resultados variaron entre invernadero y campo. En bandejas, el uso del producto tuvo un impacto negativo en el peso final y el número de espigas, siendo más eficientes los controles. Sin embargo, en campo, aunque no hubo diferencias significativas en la producción, sí se observó que tanto el peso final como el número de espigas eran superiores tras la aplicación del producto.

Estos resultados resaltan la necesidad de más investigación para evaluar interacciones específicas entre diferentes especies de AMF y cultivares de cebada, y así optimizar su uso en el futuro. En general, se concluye que es crucial entender cómo las AMF afectan a las plantas en condiciones de campo para maximizar sus beneficios y abordar factores desconocidos que pueden limitar su efectividad.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Situación actual

El término “agricultura” deriva del latín *ager*, que significa campo o tierra de labranza; y del latín *cultura*, que significa cultivo o crianza (RAE 2024). Por tanto, “agricultura” vendría a significar el cultivo o la crianza del campo. Se podría definir como el “conjunto de actividades aplicadas desarrolladas por el hombre con el fin de obtener productos vegetales útiles” (Bonciarelli, 1976). Se trata de una actividad imprescindible tanto social como económicamente, ya que permite disponer de una alimentación adecuada, a la vez que supone un motor económico esencial para grandes grupos de población (Alonso-Alija, 2024).

Sin embargo, la tasa de crecimiento de la producción agrícola ha disminuido en los últimos años, por la tendencia a simplificar procesos en busca de una mayor producción y simplicidad productiva (Ramankutty et al., 2018). Es decir, alcanzar altos rendimientos por unidad de superficie sin considerar la sostenibilidad de la producción. Para revertir la situación, es necesario resolver tres cuestiones: el suministro de nutrientes a las plantas, el aumento de la tolerancia al estrés abiótico, y la reducción de las pérdidas causadas por patógenos y plagas en los cultivos y en el manejo postcosecha (Roberts y Mattoo, 2018).

Mientras tanto, la población del planeta alcanzó los 8.000 millones de habitantes en el año 2022, con expectativas de llegar a los 10.000 millones en el año 2050 (Alonso-Alija, 2024). Esta proyección indica que el crecimiento poblacional a nivel mundial generará un aumento del 70% en la demanda de alimentos (Basiru et al., 2021). Por lo tanto, la producción de la agricultura mundial deberá duplicarse con el objetivo de alimentar a la población en constante aumento (Igiehon y Babalola, 2017). Para ello, uno de los requerimientos más importantes es el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Mironiuk y Izydorczyk, 2022).

La fertilidad de los agroecosistemas determina en gran parte la productividad de los cultivos. Ésta puede ser evaluada en base a la interacción entre sus características físicas (densidad, estructura, etc.), químicas (arcillas, materia orgánica, etc.) y biológicas (microorganismos) (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). El mantenimiento de la fertilidad del suelo ha sido tradicionalmente llevado a cabo a través de la adición de fertilizantes de síntesis (Mironiuk y Izydorczyk, 2022).

Los fertilizantes de síntesis son sustancias de origen mineral producidos por la industria química, utilizados con frecuencia para subsanar las deficiencias nutricionales inherentes a suelos sobreexplotados (Beltrán-Pineda y Bernal-Figueroa, 2022). Su uso ha dado lugar a un gran aumento en la producción de alimentos, pero también a diversos problemas en los agroecosistemas: desertificación, pérdida de biodiversidad, contaminación de acuíferos, etc. Además, la agricultura ha encontrado problemas de rentabilidad por la disminución progresiva de la eficiencia de la fertilización y los altos costos de los productos (Kopittke et al., 2019).

Estas razones muestran la importancia de encontrar soluciones de producción adecuadas, orientadas a mantener la sostenibilidad del sistema mediante la explotación racional de los recursos naturales y la aplicación de medidas adecuadas para preservar el ambiente (Jhariya et al., 2019). Es decir, el objetivo es alcanzar un agroecosistema con un flujo de energía balanceado, de forma que se autorregule y cada vez requiera menos aplicación de productos químicos (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001).

Para superar estos retos, la Comisión Europea (CE) ha adoptado un conjunto de propuestas que conforman el Pacto Verde Europeo (Reglamento (UE) 2021/1119). Su objetivo principal es reducir las emisiones netas de gases de efecto invernadero en al menos un 55 % de aquí a 2030, en comparación con los niveles de 1990. Para lograrlo, en julio de 2021 fueron presentadas las propuestas a adoptar (“Objetivo 55”). Algunas propuestas importantes son el estímulo de energías renovables y el ahorro de energía, la inversión en un transporte limpio, o la colaboración con la naturaleza para proteger el planeta y la salud (Reglamento (UE) 2021/550).

En relación con esta última, con el objetivo de alcanzar un sistema alimentario justo, saludable y ecológico, la CE se acoge a la Estrategia “De la granja a la mesa” (AESAN, 2024), cuyos objetivos generales son:

- Reducir la huella ambiental y climática del sistema alimentario.
- Liderar una transición mundial hacia la sostenibilidad competitiva.
- Aprovechar las nuevas oportunidades.
- Crear un sistema alimentario fuerte y resistente.

Es decir, establecer un sistema alimentario sostenible, cuya producción de alimentos tenga un impacto neutral o positivo en el medio ambiente, garantizando la seguridad alimentaria y la salud pública, y salvaguardando la disponibilidad de alimentos. Para ello, la PAC (Política Agraria Común) ha adoptado un plan estratégico (2020), que incluye las acciones necesarias para garantizar una producción alimentaria sostenible y cumplir los siguientes objetivos fijados para el año 2030 (AESAN, 2024):

- Reducir un 50% el uso y riesgo de los pesticidas químicos, y reducir un 50% el uso de los pesticidas más peligrosos.
- Reducir al menos un 50% las pérdidas de nutrientes, sin deteriorar la fertilidad del suelo, y reducir, al menos un 20%, el uso de fertilizantes de síntesis.
- Reducir un 50% las ventas de productos antibióticos para animales de granja y de acuicultura.
- Conseguir que al menos un 25% de las tierras agrícolas de la UE se dediquen a la agricultura ecológica.

La suma de estas políticas y medidas frente al cambio climático ha abierto la búsqueda de alternativas al uso tradicional de químicos, que complementen a otras prácticas, como la rotación de cultivos, el uso de leguminosas de cobertura, la incorporación de enmiendas orgánicas, y el uso de poblaciones de microorganismos benéficos que contribuyan a largo plazo a la recuperación (Villalobos-Martín y Fereres-Castiel, 2019). Las evidencias han

demostrado que la absorción y el uso de los nutrientes por los cultivos está controlado por microorganismos asociados a sus raíces (Basiru et al., 2021), por lo que el empleo de alternativas es necesario para lograr un desarrollo agrícola ecológica y económicamente sostenible. En este contexto aparece la alternativa de los biofertilizantes (Beltrán-Pineda y Bernal-Figueroa, 2022).

## 2.2 La cebada

### 2.2.1 Generalidades del cultivo

La cebada tiene su origen en la región del Creciente Fértil (Figura 1), en las costas del Mediterráneo, cultivado desde alrededor del año 8000 A.C. Se considera el grano cultivado más antiguo, lo que junto a su difusión de más de un centro de origen le ha llevado a desarrollar una amplia gama de variedades (Ponce-Molina et al., 2019).



Figura 1: Región del Creciente Fértil

### 2.2.2 Botánica y taxonomía

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) pertenece a la familia Poaceae, pudiéndose distinguir tres tipos principales de cebadas según el número de espiguillas que quede en cada diente del raquis. En este trabajo fue empleada aquella en la que solamente queda la espiguilla intermedia, ya que las laterales abortan, conocida como cebada de dos carreras (*Hordeum vulgare* var. *distichum*) (Guerrero-García, 1999). Sigue la siguiente clasificación taxonómica (Tabla 1):

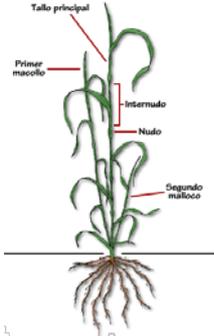
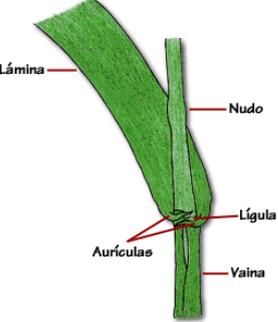
Tabla 1: Taxonomía de la cebada. Fuente: Ponce-Molina et al. (2019)

<b>Reino:</b>	Plantae (plantas)
<b>Subreino:</b>	Tracheobionta (vasculares)
<b>Superdivisión:</b>	Spermatophyta (con semilla)
<b>División:</b>	Magnoliophyta (que florecen)
<b>Clase:</b>	Liliopsida (monocotiledóneas)
<b>Familia:</b>	Poaceae (gramíneas)
<b>Género:</b>	<i>Hordeum</i> (cebada)
<b>Especie:</b>	<i>vulgare</i> L. (cebada común)
<b>Variedad:</b>	<i>distichum</i> (de dos carreras)

### 2.2.3 Morfología y fisiología

La cebada es una planta herbácea anual y hermafrodita de fecundación autógama (Molina-Cano y García del Moral, 1989). En cuanto a la morfología (Tabla 2):

Tabla 2: Características morfológicas de la cebada. Fuente: Ponce-Molina et al. (2019)

<p><b>Sistema radicular</b></p>	<p>Fasciculado, fibroso y con una profundidad máxima de 1,20m. Se estima que un 60% del peso radicular se encuentra en los primeros 25cm del suelo</p>	
<p><b>Tallo</b></p>	<p>Erecto y hueco, con una altura entre 0,50-1,20m</p>	
<p><b>Hojas</b></p>	<p>Compuestas por una vaina, una lámina, una lígula y dos aurículas. Son lineales, lanceoladas, glabras y de color verde claro</p>	
<p><b>Espigas</b></p>	<p>Formadas por espiguillas unidas directamente al raquis, de forma que se recubren unas a otras. Las glumas son alargadas y agudas en su vértice, y las glumillas (lemma y pálea) están adheridas al grano. La lemma termina en una arista más o menos larga</p>	
<p><b>Granos</b></p>	<p>Cariópsides ovales, acanalados con extremos redondeados</p>	

## 2.2.4 Importancia del cultivo

La cebada, tanto el producto principal (grano) como el residuo (paja), suele ser destinada a la alimentación del ganado. Sin embargo, la cebada de dos carreras se utiliza sobre todo para la fabricación de cerveza. Esto implica que el grano debe recogerse maduro y seco, y que no debe poseer un alto contenido en proteínas (Guerrero-García, 1999). Se trata de un cereal con gran valor energético, debido a su elevado nivel de hidratos de carbono, además de bajos niveles de grasa. También es rica en minerales, especialmente fósforo, potasio, azufre y magnesio (Tabla 3).

Tabla 3: *Composición nutricional de la cebada. Fuente: Fombellida-Villafruela (1999)*

<b>Composición media del grano de la cebada (% del peso seco)</b>									
<u>Proteína</u>		<u>Grasa</u>		<u>Minerales</u>		<u>Fibra bruta</u>		<u>H.C. Solubles</u>	
11,8		1,8		3,1		5,3		78,1	
<b>Composición mineral del grano de la cebada (mg/kg de peso seco)</b>									
<u>P</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>Na</u>	<u>Fe</u>	<u>Si</u>	<u>Mn</u>	<u>Zn</u>
356	534	240	52	145	49	4,6	420	2	3,1

Para reflejar la importancia del cultivo de cebada, se muestran los datos más recientes tanto a nivel mundial y de la Unión Europea (FAO, 2022), como a nivel de España y de Castilla y León (AEA, 2021) (Tabla 4):

Tabla 4: *Datos principales del cultivo de cebada. Fuente: FAO (2022) y AEA (2021)*

	Superficie (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)	Mayores superficies
Nivel mundial (2022)	47.147.005	154.877.140	3.285	Rusia, Australia y Turquía
Unión Europea (2022)	10.300.100	52.033.580	5.052	España, Francia y Alemania
España (2021)	2.514.561	8.863.659	3.525	Castilla y León, Castilla la Mancha y Aragón
Castilla y León (2021)	808.744	3.100.337	3.834	Valladolid, Burgos y Palencia

Llama la atención que los tres países con mayor superficie dedicada al cultivo de cebada son Rusia, Australia y Turquía; no se corresponden con los tres con mayor producción (Figura 2), que son Rusia, Australia y Francia. Rusia muestra un claro dominio, con una producción que equivale prácticamente al doble de la del segundo clasificado.

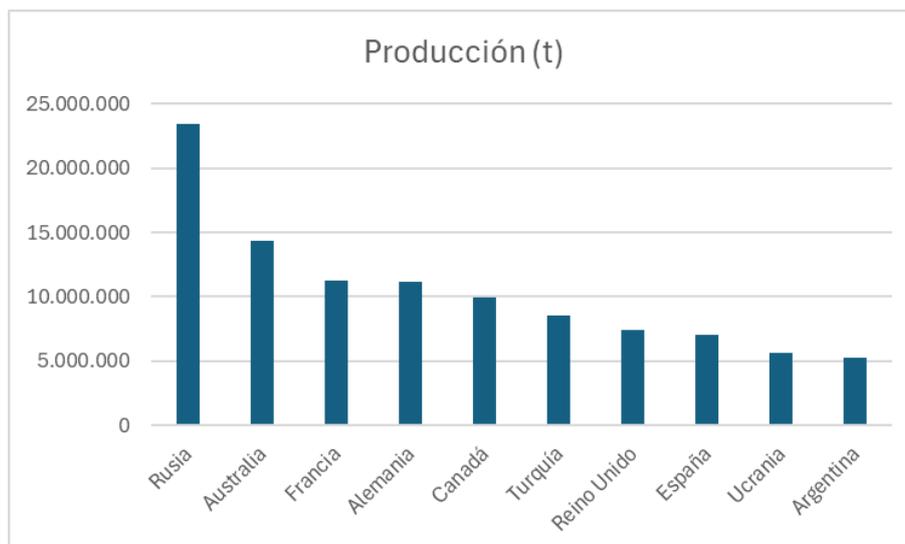


Figura 2: Principales países productores de cebada del mundo en 2022. Fuente: FAO (2022)

En caso de tener en cuenta a la UE (Unión Europea) como conjunto, se colocaría como el primer clasificado, puesto que su producción es de más de 52 millones de toneladas. Si se analiza por países (Figura 3), los tres países con mayor superficie son los mismos con mayor producción, pero en distinto orden: España cae al tercer puesto, lo que significa que sus rendimientos son menores que en Francia y en Alemania.

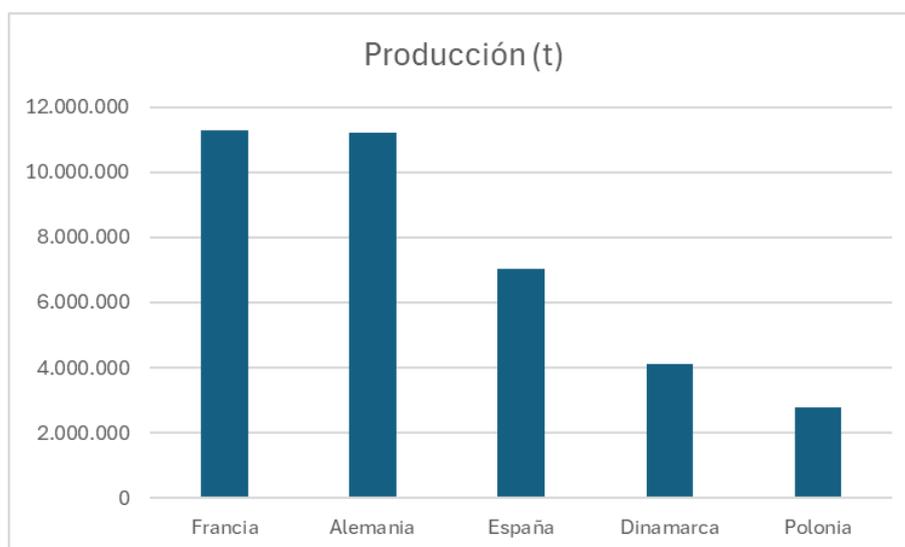


Figura 3: Principales países productores de cebada de la UE en 2022. Fuente: FAO (2022)

En 2021 (último año con registros del AEA) se produjeron en España 8.863.659 toneladas de cebada, siendo sus principales valedores Castilla y León, Castilla la Mancha y Aragón (Figura 4). Se trata del cereal grano con mayor superficie y producción en España, muy próximo al trigo (Tabla 5).

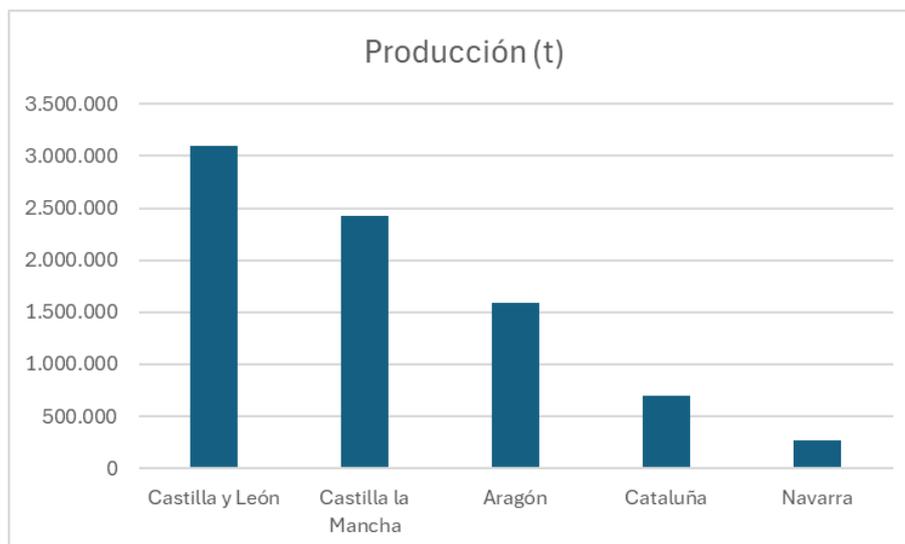


Figura 4: Principales CCAA productoras de cebada de España en 2021. Fuente: AEA (2021)

Tabla 5: Resumen nacional superficie, rendimiento y producción de cereal en 2021. Fuente: AEA (2021)

Cultivos	Superficie (hectáreas)			Rendimiento (kg/ha)		Producción (toneladas)	
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	Grano	Paja cosechada
<b>CEREALES DE INVIERNO</b>							
Trigo duro	212.916	46.141	259.057	2.680	4.333	770.406	300.695
Trigo semiduro y blando	1.620.526	245.275	1.865.801	3.738	5.678	7.449.742	4.099.642
<b>TRIGO TOTAL</b>	<b>1.833.442</b>	<b>291.416</b>	<b>2.124.858</b>	<b>3.615</b>	<b>5.465</b>	<b>8.220.148</b>	<b>4.400.337</b>
Cebada de 6 carreras	225.193	26.479	251.672	2.705	4.746	734.753	385.644
Cebada de 2 carreras	1.972.708	290.181	2.262.889	3.317	5.464	8.128.906	4.161.908
<b>CEBADA TOTAL</b>	<b>2.197.901</b>	<b>316.660</b>	<b>2.514.561</b>	<b>3.254</b>	<b>5.405</b>	<b>8.863.659</b>	<b>4.547.552</b>
<b>TOTAL CEREALES</b>	<b>4.913.476</b>	<b>1.120.405</b>	<b>6.033.881</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>24.670.075</b>	<b>10.716.048</b>

Por último, destacar la importancia de Castilla y León a nivel nacional, situada como la comunidad autónoma con mayor producción de cebada, reuniendo prácticamente el 35% del total (34,98%). Las provincias que más destacan son Valladolid, Burgos y Palencia (Figura 5), que en conjunto suponen cerca del 60% de la producción de la comunidad.

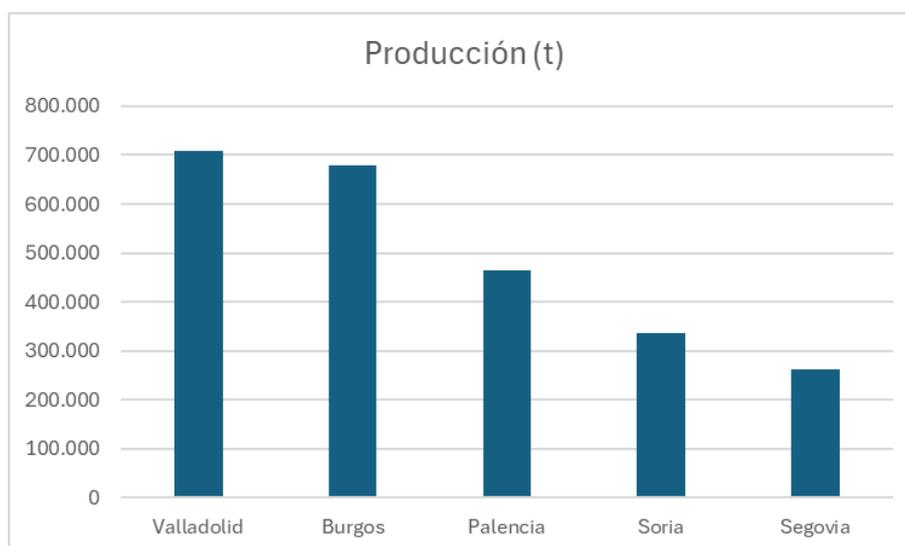


Figura 5: Principales provincias productoras de cebada de Castilla y León en 2021. Fuente: AEA (2021)

## 2.3 La biofertilización

### 2.3.1 Generalidades

Los biofertilizantes son productos que contienen microorganismos benéficos para las plantas, a menudo mutualistas, que pueden promover el crecimiento vegetal (Beltrán-Pineda y Bernal-Figueroa, 2022). Esto es posible gracias a las interacciones que provocan entre componentes bióticos y abióticos de la rizosfera, para los que son fundamentales las poblaciones microbianas. Además, impulsan la estabilidad y la productividad de los agroecosistemas, permitiendo así la conservación del suelo, desde el punto de vista de la fertilidad y biodiversidad (Igiehon y Babalola, 2017). Estas razones hacen que el desarrollo y uso de biofertilizantes se contemple como una importante alternativa para sustituir total o parcialmente los fertilizantes minerales. Los beneficios que presenta su uso son (Chaudhary et al., 2020):

- Biorremediadores: eliminan productos xenobióticos (ajenos) como pesticidas, herbicidas y fungicidas.
- Control biológico de patógenos: desarrollan fenómenos de antagonismo entre microorganismos.
- Fertilizantes: incrementan el suministro de nutrientes por su acción sobre ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N<sub>2</sub>, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos.
- Fitoestimulantes: estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias.
- Mejoradores: mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables, e incrementan la resistencia al estrés biótico y abiótico.

Estos microorganismos se encuentran de forma natural en el suelo y abarcan diversos grupos. Pueden comprender poblaciones mixtas de microorganismos naturales, como especies de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs, por sus siglas en inglés), cianobacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, bacterias y hongos supresores de enfermedades de plantas, etc. En base a esta diversidad de microorganismos, existen numerosos tipos de biofertilizantes con diversas funciones, según el tipo de cultivo. Los más difundidos son aquellos que se componen de hongos micorrícicos y PGPRs (Qiu et al., 2019).

### 2.3.2 Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre ciertos hongos del suelo y las raíces de una planta (Pina et al., 2018). De los seis tipos conocidos de asociaciones micorrícicas, uno de ellos sobresale por su importante función en plantas de interés agrícola: las micorrizas arbusculares (AMF, por sus siglas en inglés) (Carrillo-Saucedo et al., 2022). Son hongos que forman parte del orden Glomales, con 150 especies de hongos conocidas (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001).

Los AMF son biotrófos obligados, lo que quiere decir que necesitan de una planta para completar su ciclo de vida, colonizando el 80% de las plantas terrestres (Carrillo-Saucedo et al., 2022). Una de las familias de plantas con las que no forma relaciones simbióticas es Brassicaceae, porque sintetizan y acumulan en sus tejidos un grupo de metabolitos secundarios llamados glucosinolatos, que tienen una alta capacidad antifúngica (sobre todo cuando se hidrolizan a isotiocianatos) (Poveda et al., 2020).

Para alcanzar la colonización de raíces, al principio los propágulos de AMF se mantienen en el suelo en forma de esporas asexuales formadas en el suelo, fragmentos de raíces que contienen hifas y vesículas, e hifas del suelo (Brundrett y Abbott, 2002). Las esporas alimentan a las hifas germinantes a través del catabolismo de lípidos de almacenamiento durante unos pocos días. En este período, las hifas exploran el suelo en busca de un huésped. En caso de no encontrarlo, detienen su crecimiento y retraen su citoplasma a la espora, que puede volver a dormirse y reiniciar el proceso de germinación una y otra vez. Esta situación no es frecuente en la naturaleza debido a la amplia gama de huéspedes de estos hongos, pero es un sello de ser biotrofos obligados (Bonfante y Genre, 2010).

En caso de encontrarlo, la activación de la simbiosis requiere de un reconocimiento previo entre la planta y el hongo, que ocurre a través de la liberación de exudados de la planta que permiten germinar las esporas y desencadenar un biotropismo positivo del hongo hacia la planta. Este proceso de activación del hongo y atracción hacia la raíz se denomina quimiotaxis (Stephens et al., 2008). La transducción de señales incluye señales de calcio asociadas a los núcleos (spiking) que conducen a la activación de respuestas celulares y transcripcionales. El contacto con los hongos de las plantas es seguido por la formación de un hifopodio en la superficie de la raíz. La célula epidérmica contactada ensambla un aparato de pre-penetración (PPA), una agregación citoplasmática amplia donde la hifa intracelular está alojada. La colonización de las raíces procede a través de la epidermis hacia las células corticales internas mediante un proceso similar al de PPA. Finalmente, se desarrollan arbuscúlos altamente ramificados en las células corticales internas, con una extensa superficie para el intercambio de nutrientes (Figura 6) (Lanfranco et al., 2016).

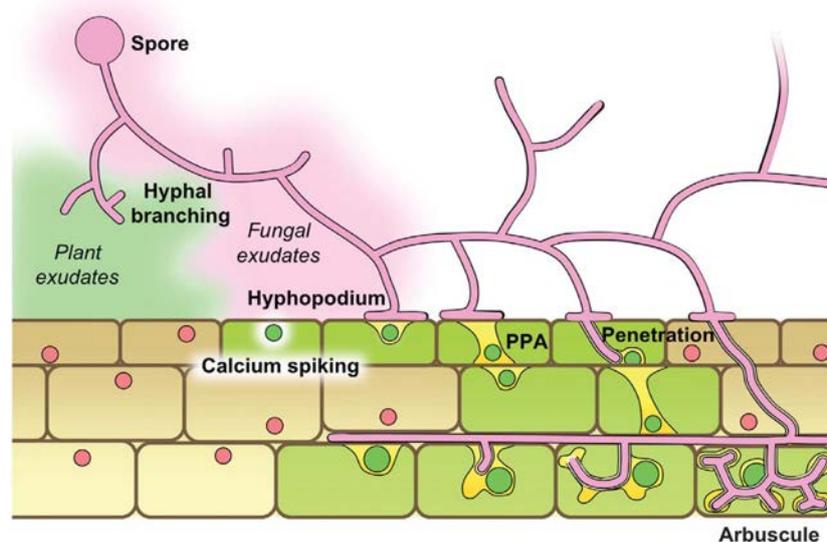


Figura 6: Colonización de la raíz por los AMF. Fuente: Bonfante y Genre, 2010

Las interacciones mutualistas que tienen lugar una vez finalizada la colonización de las raíces se basan en el intercambio de nutrientes. Los AMF basan su ciclo de vida en la absorción de carbono orgánico de las raíces de su hospedador, que es facilitado mediante transportadores de hexosa derivados de la planta. El hongo facilita los procesos de translocación de fósforo (P), nitrógeno (N) y carbono (C) en el suelo. El P inorgánico y las formas minerales u orgánicas del N, como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y aminoácidos (AA), son absorbidos por transportadores especializados ubicados en la membrana fúngica en el micelio extraradical.  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  y  $\text{P}_i$  (estos últimos se originaron en hongos AM a partir de la hidrólisis del polifosfato) son importados desde la interfaz simbiótica a las células vegetales a través de transportadores selectivos (Figura 7) (Bonfante y Genre, 2010).

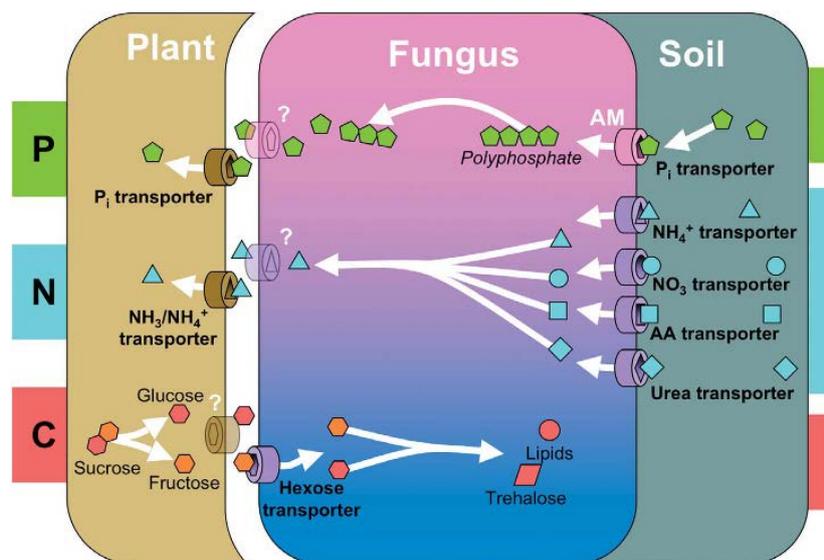


Figura 7: Intercambio de nutrientes. Fuente: Bonfante y Genre, 2010

El uso de AMF como biofertilizantes para el desarrollo de una agricultura sostenible está tomando gran importancia, ya que un aprovechamiento adecuado supone un beneficio alternativo a las prácticas de fertilización (Igiehon y Babalola, 2017). Las estrategias a través de las cuales los AMF pueden aportar beneficios a las plantas son (Delaeter et al., 2024):

- **Promotores del crecimiento vegetal:** los AMF incrementan la actividad de las raíces y su volumen de exploración, lo que permite facilitar la captación de agua y de nutrientes. También pueden modificar los niveles de hormonas vegetales (Baron y Rigobelo, 2021), asociando el mayor crecimiento de las plantas al aumento de niveles de auxinas, giberelinas y ácido salicílico, junto a la disminución de ácido abscísico y ácido jasmónico (Asim et al., 2022).
- **Inductores de tolerancia frente a estrés abiótico:** los cultivos se enfrentan a lo largo de su ciclo a diferentes estreses abióticos, como cambios de temperatura, humedad, acidez o salinidad del suelo, etc. Para reducir el efecto perjudicial de estas condiciones ambientales, los AMF inducen en las plantas la producción de: hormonas (ácido abscísico, giberelinas, etc), enzimas antioxidantes (catalasa, lipoxigenasa, etc), metabolitos secundarios antioxidantes (fenoles, flavonoides, etc) y solutos orgánicos (prolina, ácido aspártico, etc) (Tyagi et al., 2022).

- Agentes de control biológico contra patógenos y plagas: los cultivos también se enfrentan a estreses bióticos, como animales, patógenos o plantas adventicias. Los AMF presentan mecanismos directos e indirectos para reducir los daños. Directamente, pueden producir compuestos antimicrobianos volátiles y no volátiles (antibiosis), mientras que indirectamente pueden inducir las defensas de su planta huésped, tanto local como sistémicamente (Latz et al., 2018; Poveda y Baptista, 2021).

A pesar de estos beneficios, pocas especies de AMF son comercializadas globalmente como biofertilizantes (Basiru et al., 2021). Esto es debido a estándares regulatorios muy estrictos para el registro y comercialización de nuevos inóculos, la falta de estudios que demuestren su eficacia en condiciones de campo, o la dificultad para la producción masiva de inóculos (Murphy et al., 2018; Chitnis et al., 2020).

### **2.3.3 PGPRs**

Las PGPRs son bacterias que estimulan el crecimiento de las plantas cuando crecen en asociación con ellas. Existe una amplia diversidad de bacterias beneficiosas que pueden utilizarse para mejorar la productividad y la salud de los cultivos, entre los que destacan géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* o *Agrobacterium* (Poveda y Eugui, 2022). Los medios por los cuales las PGPR pueden mejorar el estado de las plantas son (Verma et al., 2018):

- Promoción del establecimiento de la simbiosis: Gracias a la estimulación de la extensión miceliar.
- Mayor disponibilidad de nutrientes y facilidad de absorción en la rizosfera: Fijación biológica de N<sub>2</sub>, solubilización de P y K, etc.
- Producción de sustancias: Fitohormonas, vitaminas, compuestos antioxidantes, enzimas, etc.
- Inducción de defensas de las plantas: Favorecen el control de microorganismos patógenos mediante sustancias nematocidas, insecticidas, etc.

El uso de distintos microorganismos de forma conjunta se llama co-inoculación, y representa importantes mejoras: por ejemplo, las funciones de algunos microorganismos pueden suplir las deficiencias de otros, como evitar la dependencia de un suministro de nitrógeno exógeno (Chaudhary et al., 2020).

Sumado a estos efectos producidos por la bacteria sobre los hongos, las micorrizas a su vez producen un impacto en la composición de comunidades bacterianas, por lo general favoreciendo la fuente nutricional de las bacterias asociadas en la rizosfera (Artursson et al., 2006). Los efectos de incremento de crecimiento de las plantas tienen lugar siempre y cuando se utilice una correcta relación AMF/PGPRs (Barea et al., 2005). Es decir, en lo que respecta a interacciones, la co-inoculación de hongos micorrícicos con rizobacterias puede proporcionar beneficios añadidos a la producción de cultivos, mejorando el desarrollo de la planta más aún que cuando se realiza exclusivamente con AMF (Igiehon y Babalola, 2017).

### 2.3.4 Emeoro MixQAP

Emeoro MixQAP es un potenciador biológico diseñado especialmente para su aplicación en cultivos hortícolas. Está compuesto por dos fracciones que trabajan de forma complementaria, proporcionado amablemente por la empresa Timac AGRO:

- Microorganismos: Micorrizas + PGPR + Levaduras.
- Complejo promotor de la actividad quimiotóxica (QAP).

Las micorrizas son del género *Glomus* (*G. deserticola*, *G. intraradices* y *G. mosseae*) y actúan como estimulantes del desarrollo vegetal, activando procesos fisiológicos e induciendo la producción de defensas naturales. Han sido cuidadosamente aisladas y seleccionadas por su adaptabilidad y eficacia en suelos de la Península Ibérica, lo que garantiza un mejor desarrollo y establecimiento en los vegetales a micorrizar.

El pool de PGPRs se compone fundamentalmente de *Bacillus megaterium*, aunque también contiene *B. coagulans* y *B. azotofixans*. Este complejo de PGPRs se obtiene en fermentadores industriales y tienen un efecto estimulante del desarrollo y crecimiento de las plantas. Del mismo modo que con las micorrizas, las cepas usadas han sido aisladas de sustratos naturales y cuidadosamente seleccionadas por su efectividad y adaptabilidad al clima, tipo de suelo y condiciones del ambiente mediterráneo.

Las levaduras utilizadas son de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, gran productor de vitamina B12 natural.

El complejo QAP es una estructura molecular que potencia la comunicación molecular (quimiotaxis) entre la raíz de la planta y la espora del hongo micorrícico, para lograr una máxima eficacia de los microorganismos aportados por el producto.

Por último, añadir que el proceso de fabricación de Emeoro MixQAP incluye un sustrato mineral arcilloso especial que actúa como encapsulante de los diferentes elementos del producto, de forma que el contacto con la humedad del suelo permite la liberación conjunta y gradual de los componentes.

### 3 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo se justifica en la necesidad de búsqueda de soluciones que contribuyan a hacer frente a los nuevos desafíos, promoviendo prácticas agrícolas más eficientes y respetuosas con el medio ambiente. Una posible solución es el uso de microorganismos en contraposición a fertilizantes de síntesis.

La hipótesis de este trabajo de investigación es que la aplicación de Emeoro MixQAP en el cultivo de cebada puede contribuir a la mejora de las condiciones del suelo, al mismo tiempo que se mejora el potencial del cultivo. Este efecto sería la consecuencia de la capacidad de la co-inoculación *Glomus* spp. - *Bacillus* spp, de colonizar las raíces de las plantas de cebada, mejorando su capacidad natural de captar nutrientes.

El objetivo general del trabajo es evaluar la viabilidad de Emeoro MixQAP como biofertilizante en cultivos extensivos de cereal. Es decir, testar su comportamiento en este tipo de cultivos, ver si son capaces de establecerse en la planta y cuál es el mejor momento y método de aplicación al cultivo. Para poder alcanzarlo, este objetivo se divide en dos objetivos específicos:

- Evaluar la técnica de aplicación que favorezca el establecimiento de las micorrizas en la planta y su efecto sobre el desarrollo de la planta y la producción final.
- Testar su potencial bioestimulante sobre la planta ante situaciones de estrés abiótico, en concreto estrés hídrico.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

El cultivo testado fue cebada de dos carreras (*Hordeum vulgare* var. *distichum*). La semilla utilizada fue de la variedad Planet, proporcionada amablemente por RAGT (Villamuriel de Cerrato, Palencia). El número de lote de las semillas utilizadas fue 13PLA5327, siendo tratada antes de su precintado en agosto del 2023 con RaxilPlus (Tebuconazol + Protioconazol).

### 4.2 Características del suelo usado en el trabajo

Los sustratos de cultivo utilizados para la realización de los ensayos fueron dos, en función de si se habla de bandejas de alveolos o de parcela de experimentación:

- Bandejas de alveolos: fue empleado sustrato comercial Terrahum<sup>®</sup> (Agrostore Ibérica), compuesto por turba de *Sphagnum* con fertilizante NPK (1,5g/L), carbonato cálcico (10 g/L) y microelementos. Sus características se describen a continuación (Tabla 6):

Tabla 6: *Contenidos y características del sustrato de cultivo Terrahum<sup>®</sup>*

Determinación	Resultado
pH (H <sub>2</sub> O)	5,5-6,5
Conductividad	0,40 mS/cm
Estructura	Fina
Materia orgánica sobre MS	90,0 g/100g
Densidad aparente seca	180 g/L

- Parcela de experimentación de la ETSIIAA: fue empleado el propio suelo de la parcela, sometido a un análisis detallado por parte del Centro Tecnológico Agrario y Alimentario ITAGRA (Tabla 7). Se trata de un suelo con un nivel normal de materia orgánica (MO), al igual que el de los carbonatos. Los niveles de fósforo, potasio, calcio y magnesio son elevados, especialmente fósforo y calcio. El nivel más deficiente es el de sodio.

Tabla 7: Informe de resultados del análisis proporcionado por ITAGRA

<b>Determinación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Método</b>
pH	8,68 ±0,14	Potenciometría PNT-S-01
Conductividad	0,12 mS/cm	Conductivímetro (1:5)
Arena	60,12 g/100g	Densímetro de Bouyoucos
Limo	8,28 g/100g	Densímetro de Bouyoucos
Arcilla	31,60 g/100g	Densímetro de Bouyoucos
Textura	Franco arenoso	-
Materia orgánica oxidable	2,50 ±0,57 g/100g	Volumetría redox. PNT-S-05
Carbonatos	11,0 ±2,2 gCaCO <sub>3</sub> /100g	Bernard PNT-S-03
Caliza activa	5,6 g/100g	Bernard
Fósforo asimilable	92,9 mg/kg	Olsen PNT-S-04
Potasio asimilable	546,0 mg/kg	ICP-OES PNT-S-07
Calcio asimilable	35,5 meq/100g	ICP-OES PNT-S-07
Magnesio asimilable	3,59 meq/100g	ICP-OES. PNT-S-06
Sodio asimilable	0,14 meq/100g	ICP-OES. PNT-S-06
Nitrógeno total	0,20 g/100g	Kjeldahl modificado

### 4.3 Bandejas de alveolos

Las bandejas de alveolos en las que fueron llevados a cabo la siembra y los ensayos con el sustrato comercial comenzaron estando situadas en un invernadero. Estas bandejas eran de diferente tamaño en función de cuál fuera su utilidad:

- Ensayo: para las plantas utilizadas durante el ensayo, bandejas de 48 alveolos (42x28cm). Debido a que la evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos y la del grado de micorrización eran de carácter destructivo, fueron necesarias al menos 32 plantas por tratamiento (16 y 16 respectivamente). Por lo tanto, se requerían al menos 96 plantas (2 técnicas de aplicación más control).
- Producción final: para las destinadas a producción final, bandejas de 20 alveolos (50x32cm). La evaluación de la producción final se llevó a cabo en 20 plantas por tratamiento, para lo cual se estimó la producción final, espigas por planta y granos por espiga. Por lo tanto, de igual forma que en el ensayo (2 técnicas de aplicación más control), se requerían al menos 60 plantas.

Para la elección de los momentos en los que llevar a cabo cada labor mencionada a continuación, se utilizó la codificación BBCH de los estadios fenológicos de desarrollo de los cereales (Witzenberger y Lancashire, 2001). Los estadios elegidos para la elaboración del trabajo en las bandejas de alveolos fueron (Figura 8):

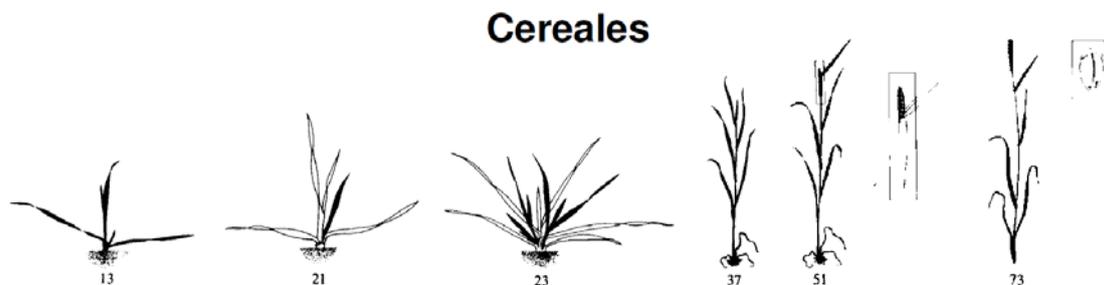


Figura 8: Ilustración de estadios fenológicos de desarrollo según la escala BBCH

- Estadio principal 0: Germinación:
  - 00: Semilla seca:
    - Pulverización en semilla, parte de ellas.
- Estadio principal 1: Desarrollo de las hojas:
  - 13: Tres hojas desplegadas:
    - Aplicación en terreno, parte de ellas (1).
- Estadio principal 2: Formación de brotes laterales:
  - 21: Un hijuelo o macolla visible:
    - Aplicación en terreno, parte de ellas (2).
  - 23: Tres hijuelos o macollas visibles:
    - Parámetros morfológicos, fisiológicos, micorrización (1).
    - Estrés hídrico durante 7 días (1).
- Estadio principal 3: Encañado:
  - 37: Aparece la última hoja (hoja bandera), aún enrollada:
    - Parámetros morfológicos, fisiológicos, micorrización (2).
- Estadio principal 5: Espigado:
  - 51: Comienzo del espigado, la punta de la espiga o panícula emerge de la vaina, una espiguilla recién visible:
    - Parámetros morfológicos, fisiológicos, micorrización (3).
    - Estrés hídrico durante 7 días (2).
- Estadio principal 8: Maduración de frutos y semillas:
  - 89: Madurez completa, grano duro difícil de dividir con la uña del pulgar:
    - Producción final.

Para combinar ambos tratamientos (más un tercero establecido como grupo de control) (ver secciones 4.2.1, 4.2.2), las bandejas se colocaron de la siguiente forma (Tabla 8), correspondiendo cada bandeja a los diferentes tratamientos (Figura 9):

Tabla 8: Distribución de bandejas según tratamientos

	PRODUCCIÓN FINAL				ENSAYO			
EMEORO	<u>PHEP</u>	<u>PEEP</u>	<u>AHEP</u>	<u>AEEP</u>	<u>PHEE</u>	<u>PEEE</u>	<u>AHEE</u>	<u>AEEE</u>
CONTROL	<u>PHCP</u>	<u>PECP</u>	<u>AHCP</u>	<u>AACP</u>	<u>PHCE</u>	<u>PECE</u>	<u>AHCE</u>	<u>AACE</u>

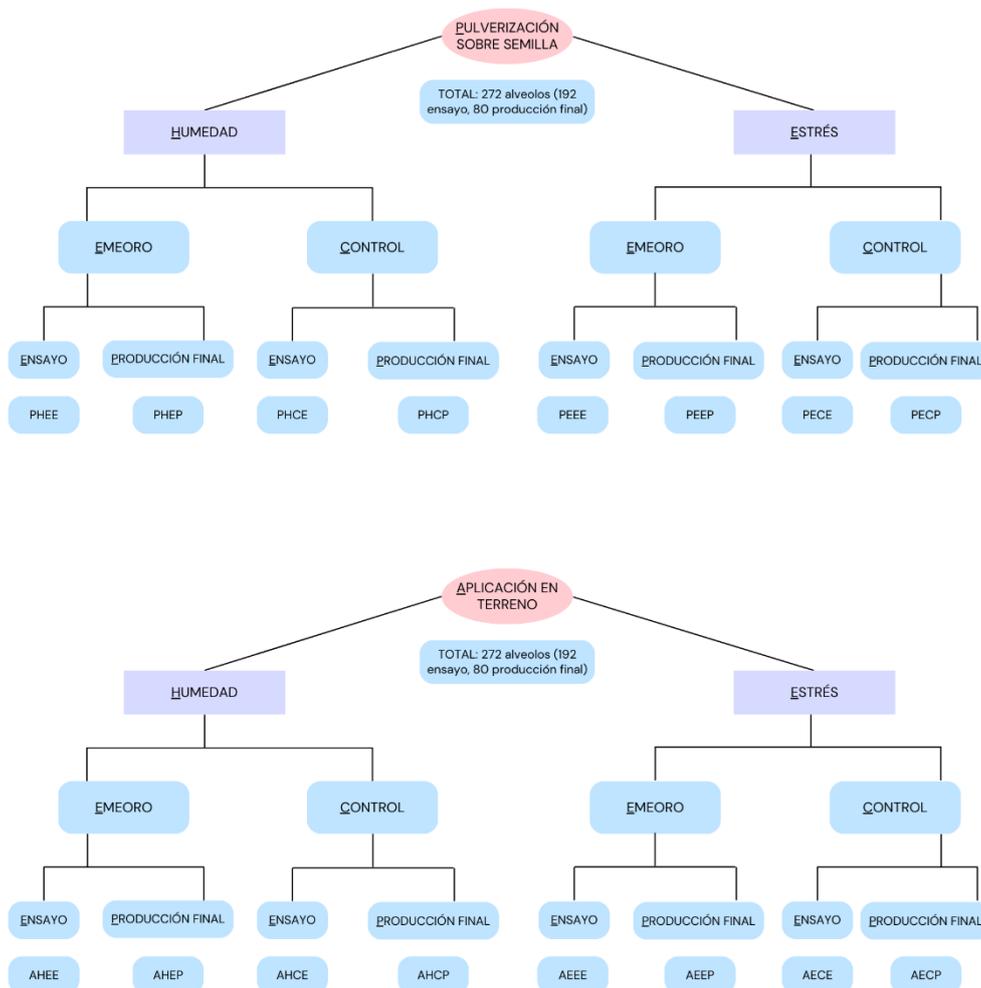


Figura 9: Reconocimiento de bandejas según tratamientos

La siembra de las semillas se llevó a cabo el 19 de febrero, colocándolas en el sustrato a una profundidad de aproximadamente 0,5cm. La dosis será 1 de semilla por alveolo, tanto en las que van a ser utilizadas para ensayo como en las destinadas a producción final. Fueron sembradas todas las bandejas:

- Las 8 bandejas de control.
- Las 4 bandejas de aplicación directa sobre semilla (PHEP, PEEP, PHEE, PEEE).
- Las 4 bandejas de aplicación en terreno (AHEP, AEEP, AHEE, AEEE).

Una vez sembradas, las bandejas de alveolos se colocaron en bandejas de inundación individuales con una altura suficiente para llenarlas de agua y que ascendiera por capilaridad hasta la parte superior. Cuando se comprobó que estaban húmedas, fueron retiradas a la mesa de estudio. A lo largo de todo el trabajo las bandejas fueron regadas cuando se consideraba necesario de forma superficial para mantenerlas en todo momento con la humedad lo más próxima posible a CC, excepto las bandejas correspondientes al estrés abiótico (ver sección 4.2.2) en los momentos explicados anteriormente.

Un mes después, el 20 de marzo, cuando comenzaron a aumentar las temperaturas, las bandejas fueron desplazadas del invernadero a una zona protegida con una malla de sombreamiento para que el sol no incidiera directamente sobre ellas y una malla anti-pájaros adicional para evitar posibles daños a lo largo de todo el desarrollo (Figura 10). Con esto se buscaba evitar posibles ahilamientos producidos por el exceso de calor y escasa humedad. Se desplazaron en una semana con altas temperaturas, para que su adaptación a las condiciones externas fuera progresiva. La disposición fue la misma que en el interior del invernadero.



Figura 10: *Bandejas recién situadas en el exterior*

La primera aplicación de producto sobre el terreno, estipulada para el BBCH 13, se realizó el 22 de marzo sobre las bandejas AHEP, AEPP, AHCE, y AEEE de forma pulverizada en mezcla con agua, aplicando agua sola a las bandejas de control para equiparar las condiciones (AHCP, AECP, AHCE, AECE). Por lo tanto, lo primero que se hizo fue pulverizar los controles con agua para después preparar la disolución con producto y pulverizar las bandejas de producto, de la misma forma que con los controles.

Al terminar se decidió regar individualmente todas las bandejas (no solo las 8 afectadas por esta aplicación), con el objetivo de no dispersar el producto pudiendo afectar a los resultados de las bandejas colindantes. Además, de esta forma el producto profundizó a nivel de las raíces, sin llegar a percolar por exceso de agua. Fueron aplicados 100mL de agua en los alveolos grandes y 50mL de agua en los alveolos pequeños.

En la aplicación de producto estipulada para el BBCH 21 (5 de abril) se siguió el mismo proceso (a las 4 bandejas de producto se les aplicó el producto con agua, y al resto de bandejas agua exclusivamente), excepto que en este caso las plantas no fueron regadas individualmente, ni las que recibieron producto ni las que no, sino que se aplicó agua por encima en pulverización.

#### ***4.3.1 Técnicas de aplicación***

El ensayo de técnicas de aplicación tiene como objetivo evaluar la eficacia del producto en función de cuál sea la técnica de aplicación empleada. Se llevó a cabo de forma paralela: en invernadero sobre sustrato comercial en bandejas de alveolos y en campo sobre la parcela de experimentación de la ETSIIAA (Figura 11). En ninguno de los casos las plantas fueron sometidas a fertilización inorgánica. Se evaluaron dos técnicas de aplicación:

- Aplicación directa sobre la semilla antes de la siembra mediante rociado a la dosis recomendada (Di Martino et al., 2022).
- Aplicación sobre el terreno mediante rociado a la dosis recomendada en los estados fenológicos BBCH 13 y BBCH 21 (Garmendia et al., 2017).



Figura 11: Ubicación de los lugares en que ha tenido lugar el trabajo, siendo: 1-Invernadero, 2-Parcela, 3-Zona protegida

Con la aplicación directa sobre la semilla se pretendía simular un tipo de “coating” que pudiera ser aplicado durante el proceso de selección, para que el agricultor no tenga que modificar su rutina habitual. Hay que tener en cuenta que la siembra fue llevada a cabo inmediatamente después de la aplicación en semilla, por lo que cabía esperar que la germinación de la semilla y de los microorganismos coincidiera. Sin embargo, en la práctica real habría que valorar si el almacenamiento de la semilla desde selección hasta siembra (1-2 meses) podría afectar a su viabilidad.

Para calcular la dosis en bandeja de alveolos, se realizó una prueba en la que 250 semillas se rociaron con agua hasta estar mojadas del todo, siendo pesadas antes y después para conocer el volumen de agua empleado. Para el cálculo, se supuso un uso de 200kg de semilla por ha y que la dosis de aplicación es de aproximadamente 2kg por ha. El resultado fue que en 1L de agua la dosis necesaria es de 5g/L (Tabla 9):

Tabla 9: *Cálculo de dosis para aplicación directa sobre la semilla*

-	$\left. \begin{array}{l} 200^{kg\ semilla}/_{1ha} \\ 2^{kg\ producto}/_{1ha} \end{array} \right\} 2kg\ producto / 200kg\ semilla$
-	El peso de 250 <i>semillas</i> = 12,59g
-	Las 250 semillas son pulverizadas hasta ser mojadas por completo, empleando para ello 30mL de agua:
-	$\left. \begin{array}{l} 200.000g\ semilla \rightarrow 2.000g\ producto \\ 12,59g\ semilla \rightarrow xg\ producto \end{array} \right\} x = 0,1259g\ producto$
-	$\left. \begin{array}{l} 30mL\ agua \rightarrow 0,1259g\ producto \\ 1000mL\ agua \rightarrow xg\ producto \end{array} \right\} x = 4,1967g\ producto$
-	Por tanto, para la aplicación directa sobre la semilla es necesaria una dosis de $5g\ producto / 1L\ agua$ , que equivale a $2kg\ producto / 1ha$ .

Con la aplicación sobre el terreno se buscaba aplicar el producto en los momentos en que el agricultor entra en la tierra para realizar diferentes labores, de forma que no tenga que modificar su itinerario habitual. Para calcular la dosis en bandeja de alveolos, se realizó una prueba para ver que cada pulverización de un pulverizador corriente expulsa 1 mL de líquido. Con el objetivo de distribuir lo más uniformemente posible el producto en cada alveolo, se estimó que realizar 24 pulverizaciones en cada bandeja (12 en la parte superior y 12 en la parte inferior) es suficiente. Con esta cantidad, 24 mL de líquido por bandeja, podemos mantener la concentración de 5 g/L y, posteriormente, regar para simular una posible lluvia post-aplicación en la realidad.

#### 4.3.2 Estrés abiótico

El ensayo de estrés abiótico tiene como objetivo evaluar el potencial bioestimulante del producto y sus efectos sobre la capacidad de resiliencia de las plantas frente a estreses abióticos. Se llevó a cabo solo en invernadero, sobre sustrato comercial en bandejas de alveolos. En este caso se analizó la respuesta producida por la planta frente a un estrés hídrico forzado durante 7 días en dos momentos: BBCH 23 y 51 (Varga et al., 2015).

En combinación con el ensayo de técnicas de aplicación, la mitad de las plantas tratadas con producto y la mitad de las no tratadas se mantuvieron a capacidad de campo (CC), mientras que la otra mitad de cada tratamiento fueron sometidas a un proceso de sequía, simulando una falta de agua. Para ello, dejaron de ser regadas durante una semana, en la que se observaban regularmente para comprobar su estado.

#### 4.4 Parcela de experimentación de la ETSIIAA

De nuevo, se recurrió a la codificación BBCH de los estadios fenológicos de desarrollo de los cereales (Witzenberger y Lancashire, 2001) (Figura 7), para elegir los estadios en los que llevar a cabo el trabajo en la parcela:

- Estadio principal 0: Germinación:
  - 00: Semilla seca:
    - Pulverización en semilla, parte de ellas.
- Estadio principal 1: Desarrollo de las hojas:
  - 13: Tres hojas desplegadas:
    - Aplicación en terreno, parte de ellas (1).
- Estadio principal 2: Formación de brotes laterales:
  - 21: Un hijuelo o macolla visible:
    - Aplicación en terreno, parte de ellas (2).
- Estadio principal 5: Espigado:
  - 51: Comienzo del espigado, la punta de la espiga o panícula emerge de la vaina, una espiguilla recién visible:
    - Parámetros morfológicos, fisiológicos, micorrización.
- Estadio principal 8: Maduración de frutos y semillas:
  - 89: Madurez completa, grano duro difícil de dividir con la uña del pulgar:
    - Producción final.

La distribución de los tratamientos en la parcela fue de bloques aleatorios, para que la variación de las condiciones ambientales no fuera condicionante (Tabla 10). Debido a que en este caso no se realizaron ensayos de estrés abiótico, sino que se dejó en manos de las condiciones ambientales, y contando con el espacio disponible en la parcela, la decisión final fue (Figura 12):

Tabla 10: *Distribución de parcelas según tratamientos*

BLOQUE 1				BLOQUE 2				BLOQUE 3			
P E1	A C1	A E1	P C1	A E2	P E2	A C2	P C2	P E3	A C3	P C3	A E3

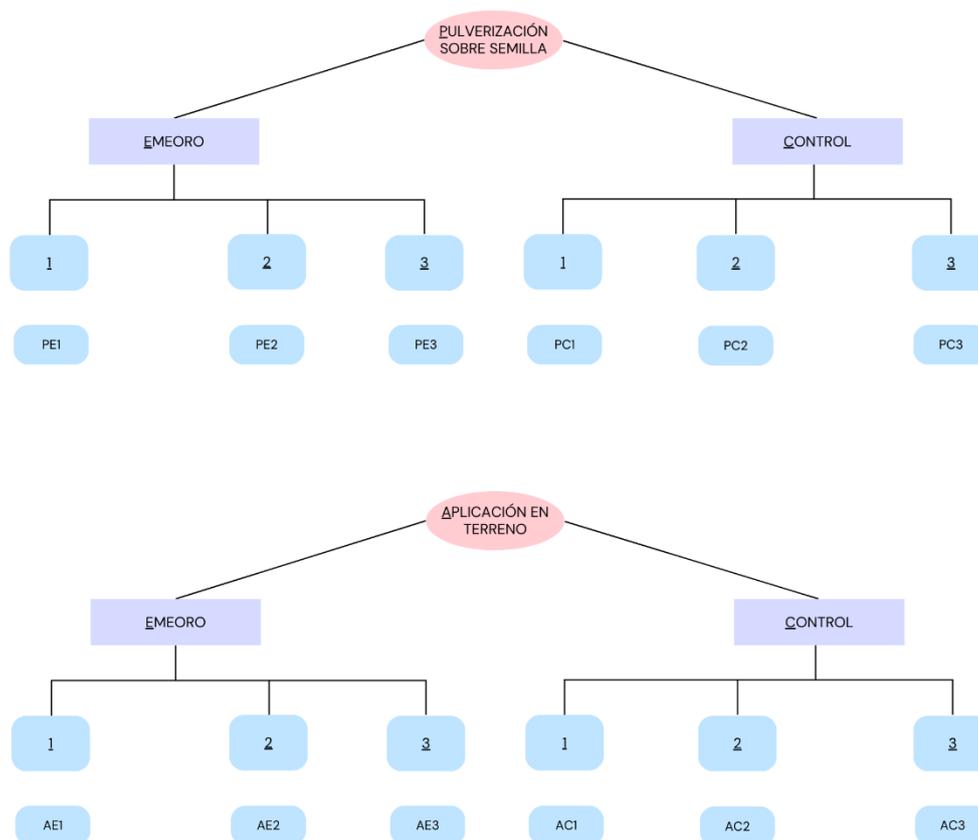


Figura 12: Reconocimiento de parcelas según tratamientos

Los preparativos para la siembra en parcela comenzaron el 21 de febrero, utilizando un rotovator para realizar una labor superficial y de esta forma adecuar el terreno lo máximo posible. Para calcular la dosis de semilla se supuso una dosis teórica a modo de objetivo a alcanzar, que se fijó en la dosis habitual en la práctica real, 200 kg/ha. Al hacer parcelas de 2 x 2 m, con una separación entre ellas de 0,8 m, se decide emplear 2 m de largo pero solo 1,5 m de ancho, dejando 0,25 m de margen a cada lado. El espacio es dividido en 7 filas, con una distancia entre ellas también de 0,25 m.

La siembra fue llevada a cabo mediante una sembradora manual Mophorn de 1 hilera. Para elegir qué disco es el más adecuado, se hicieron pruebas con la sembradora con dos discos de diferente tamaño. Tras dos pruebas con cada uno, para así hacer una media para cada disco, los resultados (Tabla 11) mostraron que el disco pequeño se aproximaba más a la dosis teórica.

Tabla 11: Cálculo de dosis de semilla en parcela

- Dosis teórica:  $200 \text{ kg/ha}$
- Dosis disco grande:
 
$$\left. \begin{array}{l} \text{En } 4\text{m} \rightarrow 34,55\text{g} \\ \phantom{\text{En } 4\text{m} \rightarrow} 33,50\text{g} \end{array} \right\} \left. \begin{array}{l} \text{En } 14\text{m} \rightarrow 120,925\text{g} \\ \phantom{\text{En } 14\text{m} \rightarrow} 117,250\text{g} \end{array} \right\} \text{En } 4\text{m}^2 \rightarrow \approx 120\text{g}$$

$$\text{En } 10.000\text{m}^2 \rightarrow \approx 300.000\text{g} = 300 \text{ kg/ha}$$
- Dosis disco pequeño:
 
$$\left. \begin{array}{l} \text{En } 4\text{m} \rightarrow 16,16\text{g} \\ \phantom{\text{En } 4\text{m} \rightarrow} 18,00\text{g} \end{array} \right\} \left. \begin{array}{l} \text{En } 14\text{m} \rightarrow 56,56\text{g} \\ \phantom{\text{En } 14\text{m} \rightarrow} 63,00\text{g} \end{array} \right\} \text{En } 4\text{m}^2 \rightarrow \approx 60\text{g}$$

$$\text{En } 10.000\text{m}^2 \rightarrow \approx 150.000\text{g} = 150 \text{ kg/ha}$$

A continuación, conociendo la dosis por parcela y sabiendo que iban a ser sembradas 12 parcelas, se preparó la cantidad de semillas necesaria. Las semillas se pulverizaron, parte de ellas con agua y producto, y otra parte de ellas solo con agua, y se dejaron secar durante dos horas. De esta forma, tanto para las tratadas con producto como para los controles, se evitó el problema de adherencia al disco de la sembradora por la humedad, y se redujeron los errores durante la siembra. Una vez finalizada la siembra de las doce parcelas, cada una de ellas fue correctamente etiquetada con el tratamiento correspondiente. Además, se verjó el perímetro de la parcela para evitar la entrada de conejos (Figura 13):



Figura 13: Parcelas sembradas, etiquetadas y verjadas

La primera aplicación de producto sobre las parcelas, estipulada para el BBCH 13, fue llevada a cabo el 15 de abril de forma similar a la de las bandejas. Primero se aplicó agua a las parcelas de control, para luego aplicar agua y producto en las parcelas que lo requieran con la dosis de producto previamente establecida. Tras aplicar, todas las parcelas fueron regadas.

De nuevo, cuando las plantas alcanzaron el estado BBCH 21 el 26 de abril, se llevó a cabo la siguiente aplicación siguiendo la misma metodología que para la primera.

#### 4.4.1 Técnicas de aplicación

En el ensayo de técnicas de aplicación en la parcela de experimentación de la ETSIIAA (Figura 10) se evaluaron las mismas dos técnicas de aplicación (directa sobre la semilla y sobre el terreno). La dosis para la aplicación directa sobre la semilla fue la misma que en la utilizada en bandeja de alveolos (5 g/L) (Tabla 9). Para calcular la dosis para la aplicación sobre el terreno en parcela primero se llevaron a cabo pruebas para comprobar cuál era el caudal de las boquillas de aspersion a utilizar, comprobando que gastaba 3,1 L en 13 m recorridos a paso normal. Entonces se pasó a calcular la concentración de la mezcla adecuadamente. El resultado final fue aplicar a una dosis de 3 g/L, que equivale a 2,5 kg/ha (Tabla 12):

Tabla 12: Cálculo de dosis para aplicación sobre el terreno en parcela

-	$\left. \begin{array}{l} 12 \text{ parcelas} \\ 2 \text{ m longitud} / 1 \text{ parcela} \end{array} \right\} 24 \text{ m} \rightarrow 30 \text{ m por seguridad}$
-	El gasto de agua en 13m recorridos = 3.100mL
-	$\left. \begin{array}{l} 13 \text{ m longitud} \rightarrow 3.100 \text{ mL agua} \\ 1 \text{ m longitud} \rightarrow x \text{ mL agua} \end{array} \right\} x = 238,5 \text{ mL agua} \rightarrow 250 \text{ mL}$
-	$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ m longitud} \rightarrow 250 \text{ mL agua} \\ 30 \text{ m longitud} \rightarrow x \text{ mL agua} \end{array} \right\} x = 7.500 \text{ mL agua} \rightarrow 8.000 \text{ mL}$
-	Esta cantidad de agua se divide en 5L de agua para 9 parcelas con agua (6 semilla y 3 terreno) y 3L de agua para 3 parcelas con agua+producto (3 terreno, equivalentes a 9m <sup>2</sup> ).
-	Suponiendo de nuevo la concentración de 2kg/ha:
-	$\left. \begin{array}{l} 10.000 \text{ m}^2 \rightarrow 2.000 \text{ g producto} \\ 9 \text{ m}^2 \rightarrow x \text{ g producto} \end{array} \right\} x = 1,8 \text{ g producto}$
-	$\left. \begin{array}{l} 3 \text{ parcelas} \rightarrow 1,8 \text{ g producto} \\ 1 \text{ parcela} \rightarrow x \text{ g producto} \end{array} \right\} x = 0,6 \text{ g producto}$
-	Como cada parcela mide 2m de largo, y para necesito 250mL/m, la dosis necesaria a aplicar es de:
-	$\left. \begin{array}{l} 250 \text{ mL agua} \rightarrow 0,6 \text{ g producto} \\ 1.000 \text{ mL agua} \rightarrow x \text{ g producto} \end{array} \right\} x = 2,4 \text{ g producto} \rightarrow 3 \text{ g producto} / \text{L agua}$

## 4.5 Ensayos

En ambos casos, bandejas de alveolos y parcela de experimentación de la ETSIIAA, se evaluaron el grado de micorrización y los estados morfológico y fisiológico de las plantas. Como se explicó anteriormente, las evaluaciones se llevaron a cabo según la monografía BBCH:

- Bandejas de alveolos: en tres estados fenológicos (BBCH 23, 37, 51). Cuatro réplicas fueron evaluadas por cada bandeja de ensayo, un total de 32 plantas en cada evaluación.
- Parcela de experimentación: en un estado fenológico (BBCH 51). Tres réplicas fueron evaluadas por cada parcela, por lo que nueve en cada evaluación.

Además, en el estado BBCH 89 se evaluó la producción final.

### 4.5.1 Ensayo de micorrización

La cuantificación del grado de micorrización se llevó a cabo mediante técnicas de tinción simple, y se cuantificaron el número de arbusculos y vesículas formadas.

Para la tinción se llevaron a cabo los pasos según Elliott et al. (2021), con algunas modificaciones, que consiste en: enjuagar las raíces con agua del grifo para eliminar las partículas sólidas del sustrato. Una vez limpias, se secan con papel de filtro y se cortan en trozos de 1cm de largo manteniendo exclusivamente la parte central de las raíces y eliminando la más próxima a la parte aérea y la más nueva o en desarrollo. Se introducen en tubos Falcon de 15 mL, para ser sumergidas en una solución de KOH al 10% durante 60min a 80°C. Posteriormente, se pasan a una solución con “tinta china” SheafferSkrip (Sheaffer Pen Company, EEUU) durante 20min a 80°C (5% de tinta en ácido acético al 5%, 90% de agua destilada). Por último, el exceso de tinta se elimina aclarando con agua destilada y manteniendo las raíces con ácido acético al 5% durante 24h en dos ocasiones. Se conservan en agua destilada a 4 °C.

Para la cuantificación se llevaron a cabo los pasos según García et al. (2020), utilizado para estimar la proporción en porcentaje de raíces colonizadas y no colonizadas. La cuantificación se llevó a cabo contando cuántas raíces presentan al menos una forma de micorriza (arbusculos y/o vesículas), sobre el total. Para ello se emplea una cuadrícula de 1 cm x 1 cm sobre una placa Petri, permitiendo al observador cuantificar de forma adecuada las raíces. Se distribuyen uniformemente en la placa Petri, y con una lupa se escanean líneas de cuadrícula vertical y horizontal para registrar la presencia o ausencia de colonización en cada punto donde las raíces cruzan una línea (Figura 14).

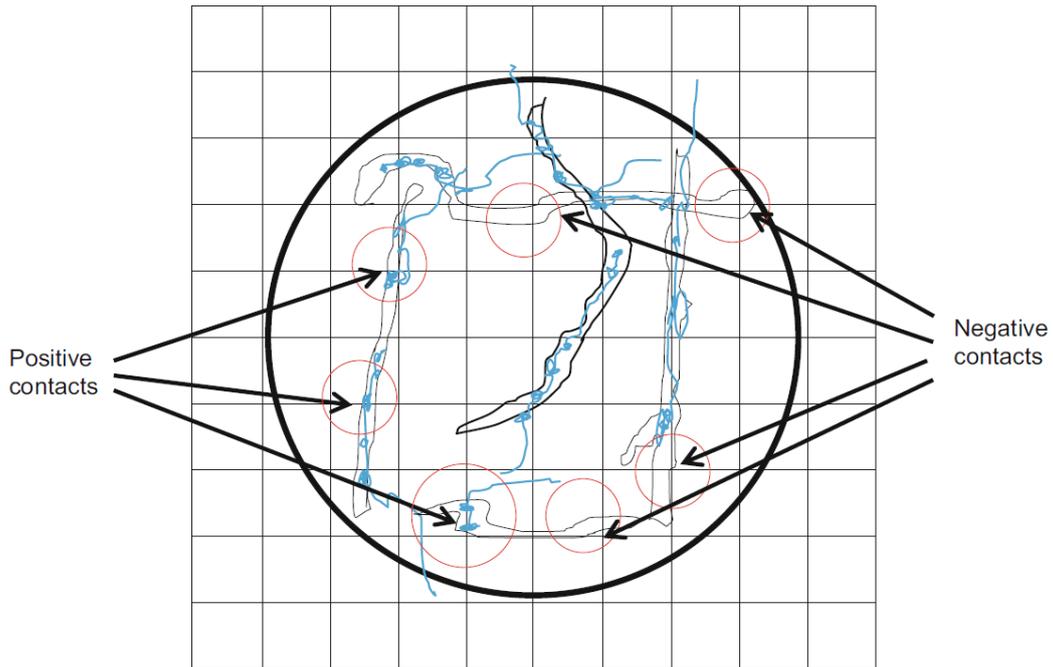


Figura 14: Esquema que muestra el método de intersección de líneas de cuadrícula para cuantificar la colonización de AMF en raíces micorrícicas. Basado en el método descrito por Giovannetti y Mosse (1980). Fuente: García et al. (2020)

#### 4.5.2 Ensayo de crecimiento

Los parámetros morfológicos a evaluar fueron la altura, el peso húmedo radicular y el peso húmedo foliar. Para ello fueron utilizadas una regla y una báscula de precisión.

Los parámetros fisiológicos a evaluar fueron el NBI (Índice de Equilibrio de Nitrógeno), la clorofila, los flavonoides y los antocianinos. Para ello fue utilizado el analizador de hojas Dualex Scientific+ (AgriExpo, Ago 2024), capaz de medir de forma instantánea y no destructiva (Figura 15).

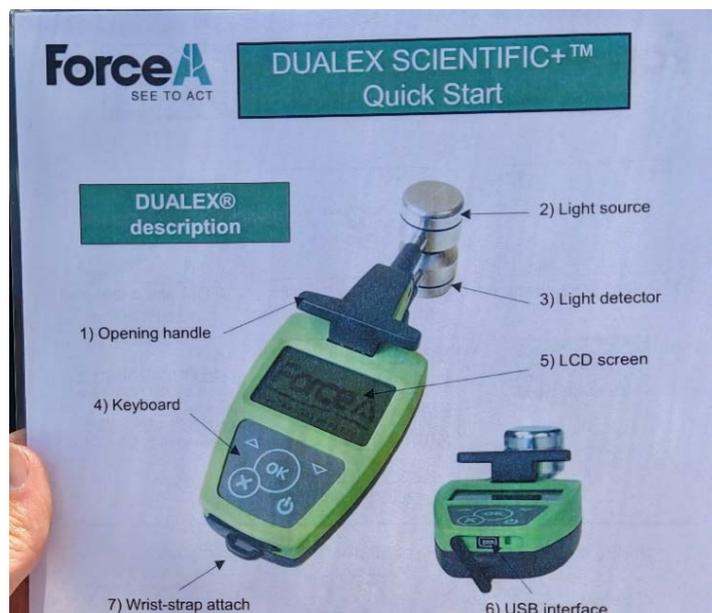


Figura 15: Información sobre el medidor Dualex Scientific+

#### 4.5.3 Ensayo de producción final

La evaluación de producción final en las bandejas de alveolos consistió en contar el número de espigas de cada alveolo, el número de granos de cada espiga y se pesan los granos para extrapolar la producción a kg/ha.

Sin embargo, en la parcela de experimentación de la ETSIIAA la evaluación fue más compleja. Se decidió usar únicamente el metro cuadrado correspondiente al centro de cada parcela, de forma que se eliminó el “efecto borde” delimitando la zona de cosecha (Figura 16). En este caso, se contó el número de espigas por metro cuadrado (parcela), el número de granos de 20 espigas de cada parcela, y se pesaron los granos de todas las espigas para extrapolar la producción a kg/ha y también conocer el peso específico.



Figura 16: Delimitación del metro cuadrado considerado en cada parcela

La cosecha de las espigas fue llevada a cabo mediante una máquina cosechadora manual (REICHHARDT, Ago 2024), parcela a parcela, para poder conocer el peso final de cada una por separado (Figura 17).



Figura 17: Espigas de cada parcela separadas para ser cosechadas mediante la máquina cosechadora Minibatt+ Brushless

Por último, el peso específico fue medido mediante una balanza de Cobos (Figura 18), siguiendo para ello los pasos de la norma correspondiente (PN-73/R-74007, 1973).



Figura 18: *Balanza de Cobos*

#### 4.6 Análisis estadístico

Para evaluar las mediciones obtenidas en los ensayos de técnicas de aplicación y estrés abiótico, tanto los datos registrados en los parámetros morfológicos y fisiológicos como los registrados en la producción final, se utilizó el ANOVA (Análisis de Varianza) y test de comparaciones múltiples. Este análisis permitió determinar si los tratamientos aplicados tuvieron un efecto significativo en el crecimiento del cultivo. La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza fue analizada para cada variable por medio del Test Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. En aquellos casos que se cumplieron tanto la normalidad como la homogeneidad de varianzas, se efectuó un ANOVA clásico de un factor y un test HSD Tukey. Por el contrario, para aquellas variables en las que alguna de las dos condiciones no se cumplió, se aplicaron métodos robustos (García-Pérez, 2010). En concreto, se realizó un ANOVA de un factor; y un test de comparaciones múltiples usando el procedimiento generalizado de Welch aplicando una transformación mediante un recorte de 0,2 de las colas. Para ello, se usó el paquete WRS2 (Wilcox' Robust Statistics) implementado en el software R (Mair y Wilcox, 2020).

Para evaluar el grado de micorrización, se llevó a cabo un análisis de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson. Este análisis se empleó para evaluar si el producto había sido capaz o no de establecerse en el sistema radicular del cultivo, y en caso de que sí, de qué manera era más exitoso.

Todos los datos obtenidos en las mediciones se procesaron utilizando el lenguaje de programación R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Pruebas de micorrización

#### 5.1.1 Análisis de micorrización en bandeja de alveolos

El modo de aplicación directa sobre semilla hizo que la micorrización de los AMF fuera significativamente mayor en comparación a la aplicación sobre la planta, tanto en estado BBCH 23 ( $p = 0,0206$ ), como en BBCH 37 ( $p = 0,0000383$ ). También en BBCH 51, aunque en este caso no de forma significativa. Sin embargo, las condiciones de humedad o estrés no fueron claras, ya que en tres ocasiones funcionaron mejor con humedad (BBCH 37 sobre semilla aunque no significativamente, BBCH 51 sobre semilla ( $p = 0,0035$ ) y BBCH 51 sobre terreno ( $p = 0,0344$ ), y en otras tres ocasiones funcionaron mejor con estrés hídrico (BBCH 23 sobre semilla y BBCH 23 sobre terreno aunque no significativamente, BBCH 37 sobre terreno ( $p = 0,00091$ )) (Figuras 19.1, 19.2, 19.3).

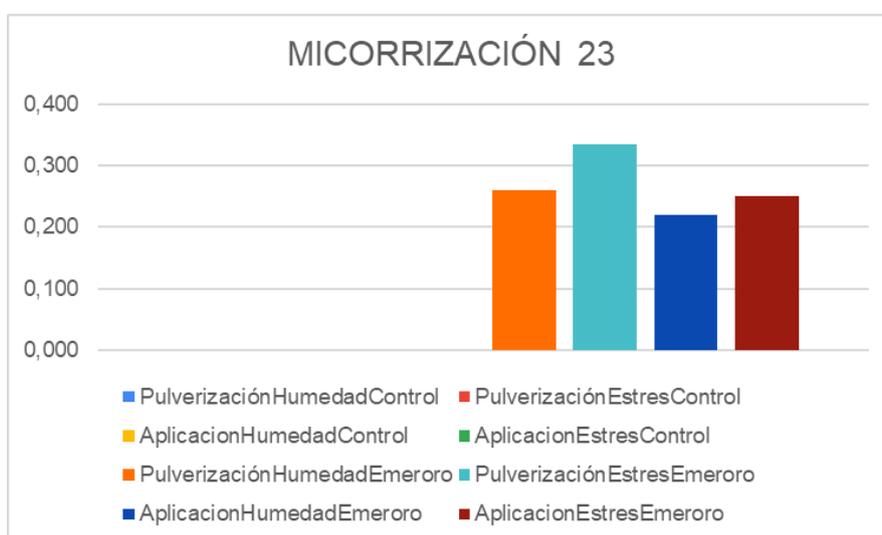


Figura 19.1: Evolución de la micorrización en bandeja de alveolos (BBCH 23)

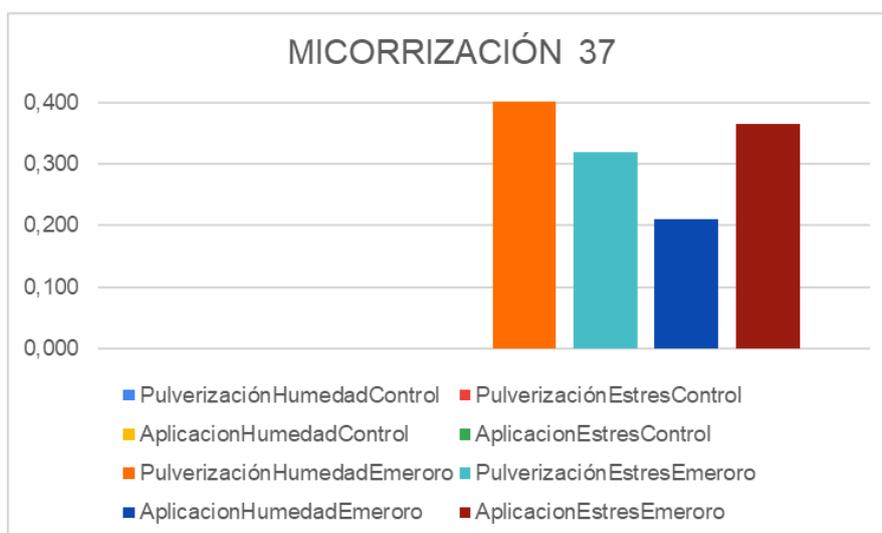


Figura 19.2: Evolución de la micorrización en bandeja de alveolos (BBCH 37)

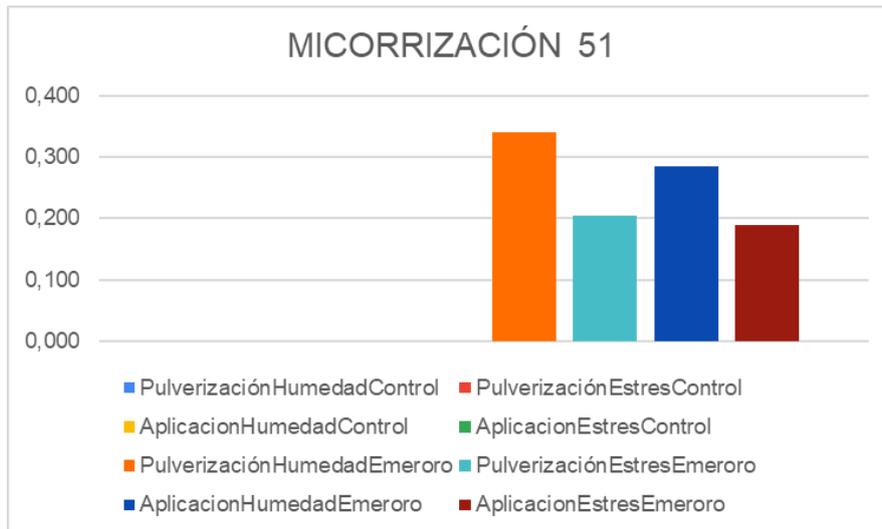


Figura 19.3: Evolución de la micorrización en bandeja de alveolos (BBCH 51)

### 5.1.2 Análisis de micorrización en parcela

La única diferencia significativa en la micorrización en parcela, medida en estado BBCH 51, tuvo lugar entre los controles de semilla y de terreno por una pequeña contaminación. El resto de diferencias existentes no fueron significativas, ya que el producto funcionó prácticamente igual tanto sobre semilla como sobre terreno (Figura 20).

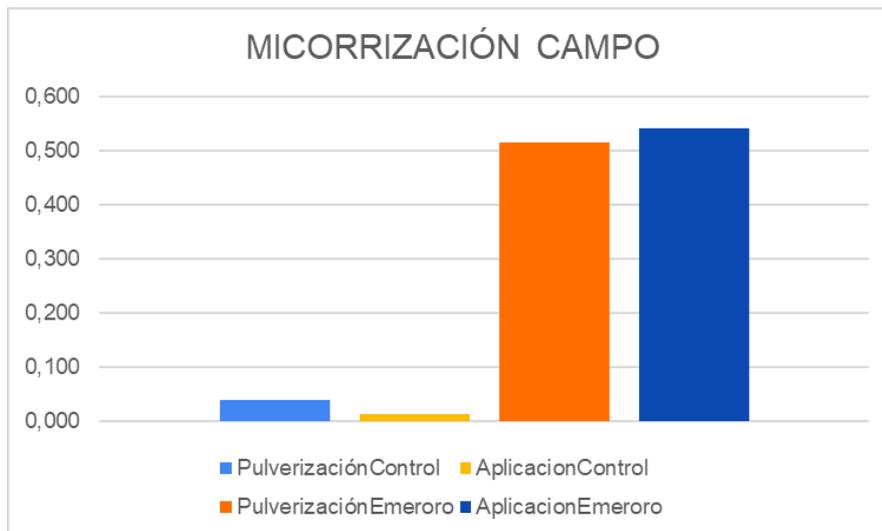


Figura 20: Evolución de la micorrización en parcela

## 5.2 Pruebas de crecimiento

### 5.2.1 Análisis de crecimiento en bandeja de alveolos

El porcentaje de germinación en las bandejas fue del 96%, como cabía esperar según los datos de esta variedad. Cabe mencionar que tras la primera prueba de estrés hídrico (BBCH 23), se observó que el estado de las plantas aplicadas era notablemente diferente al de las no aplicadas (Figura 21). Por este motivo se dio por finalizada la prueba, ya que las plantas sometidas podrían haberse visto demasiado mermadas en caso de haberla continuado, y llegar a afectar al ensayo. Para recuperar el estado de las plantas sin darles

una cantidad excesiva de agua de repente, todas fueron regadas superficialmente por aspersión. Mientras tanto, la segunda prueba (BBCH 51) no manifestó ningún problema tan importante, razón por la cual se continuó durante los 7 días previstos.



Figura 21: Estado de las plantas tras la primera prueba de estrés hídrico

El primer apartado a valorar fue el tiempo que tardaron las plantas en avanzar de fase. Para ello se sumaron los datos de las medias de cada fase. Se puede observar que, mientras que las diferencias en los controles apenas son apreciables, en las plantas con producto sí que destacan, con un aumento general de unos tres días (Figura 22). Además, aunque no hay datos que lo reflejen ya que se dejaron de anotar fechas en el estado BBCH 51, las plantas con producto tardaron más tiempo en madurar que los controles. Cuando los controles ya estaban maduros y listos para su cosecha, las plantas con producto aún estaban verdes, necesitando aproximadamente dos semanas más para la madurez.

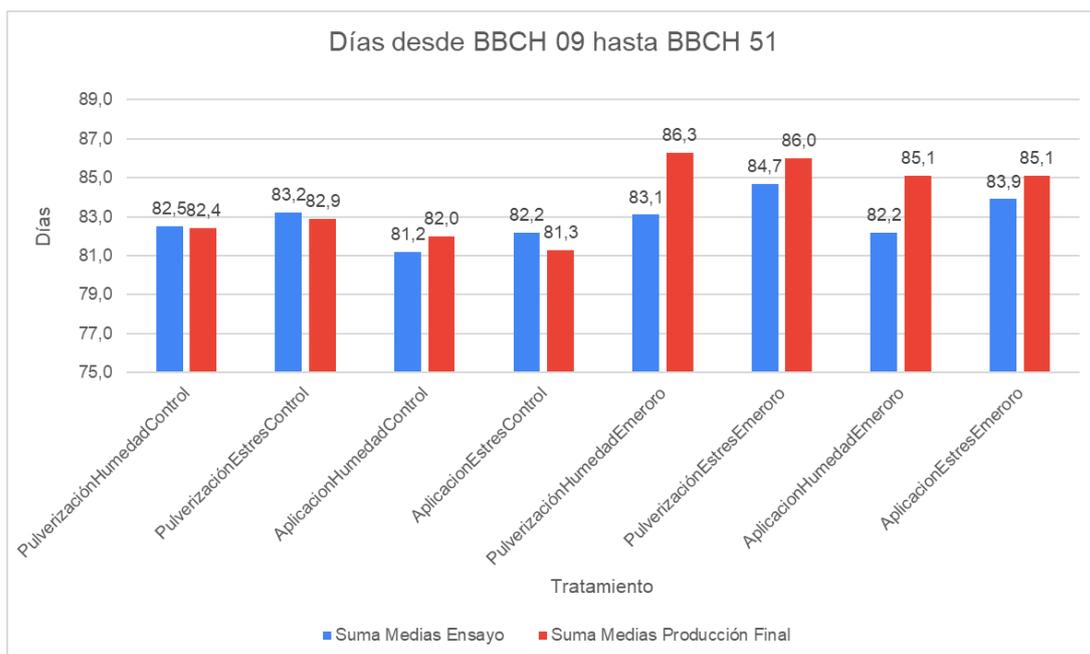


Figura 22: Días desde BBCH 09 hasta BBCH 51

Dentro del siguiente apartado, los parámetros morfológicos y fisiológicos, hay dos formas de hacer referencia a los diferentes puntos que fueron evaluados. En primer lugar, pueden ser analizados desde el punto de vista de los estados BBCH, observando cuál ha sido la evolución de las plantas considerando los parámetros de forma general (Figuras 23.1, 23.2, 23.3, 23.4, 23.5, 23.6). En segundo lugar, pueden ser analizados desde el punto de vista de los parámetros, uno por uno siguiendo los estados BBCH (Figuras 24.1, 24.2, 24.3, 24.4, 24.5, 24.6, 24.7). Sin embargo, no fueron analizados en R debido a que las réplicas de control no eran suficientes, aunque sí que lo fueran las de plantas con producto. Se puede observar lo siguiente:

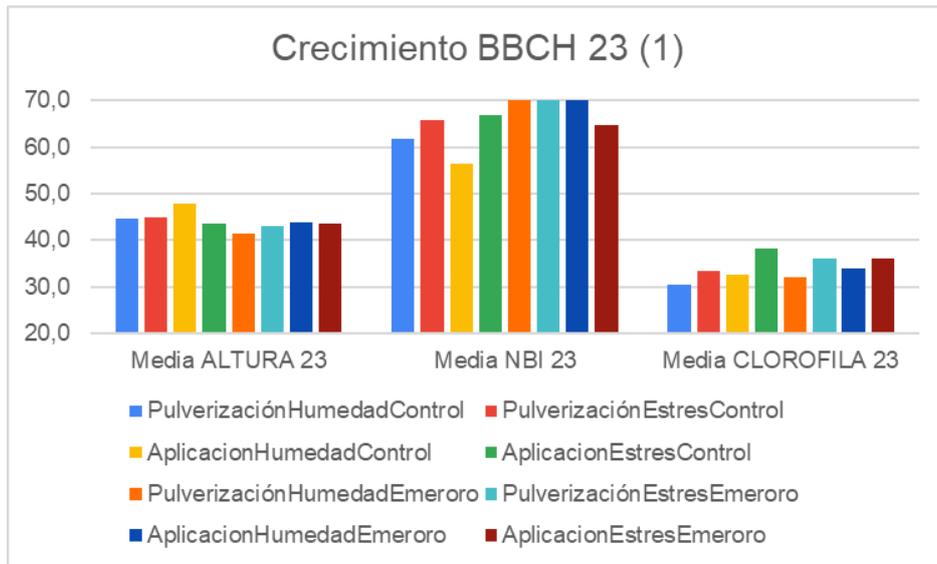


Figura 23.1: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos del estado BBCH 23 (1)

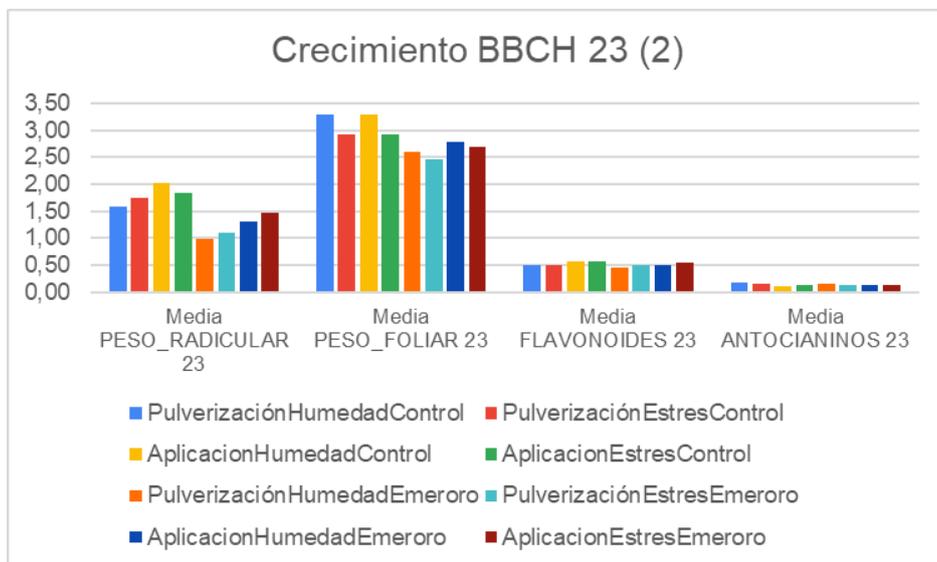


Figura 23.2: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos del estado BBCH 23 (2)

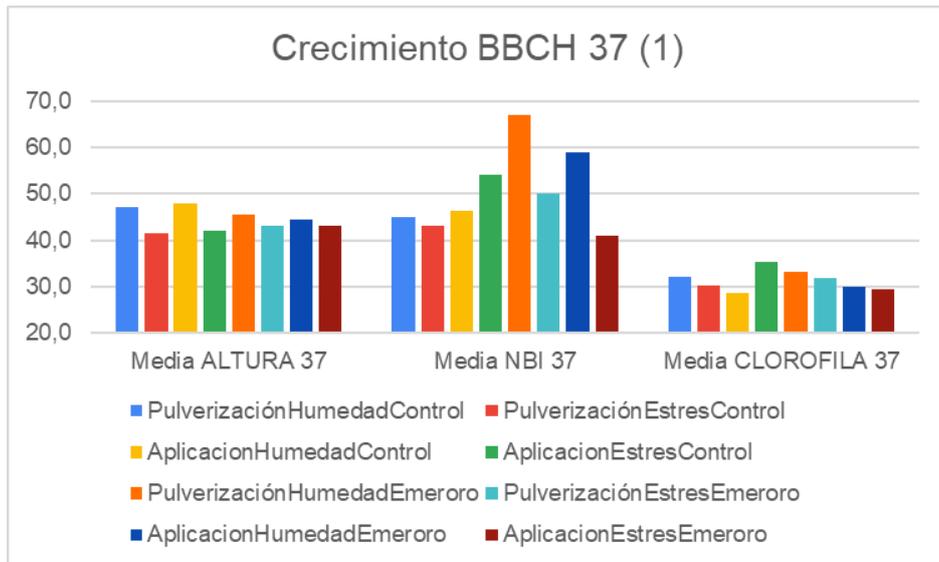


Figura 23.3: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos del estado BBCH 37 (1)

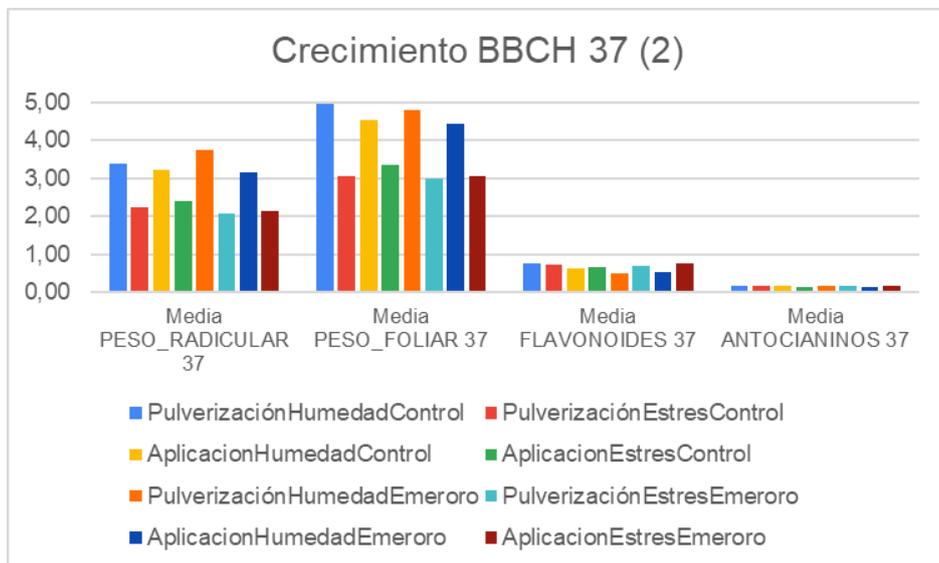


Figura 23.4: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos del estado BBCH 37 (2)

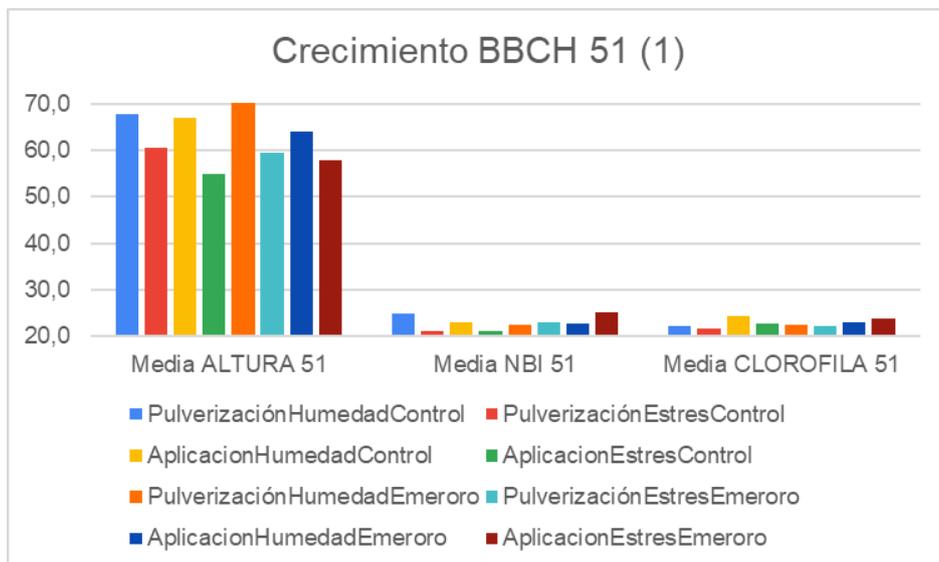


Figura 23.5: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos del estado BBCH 51 (1)

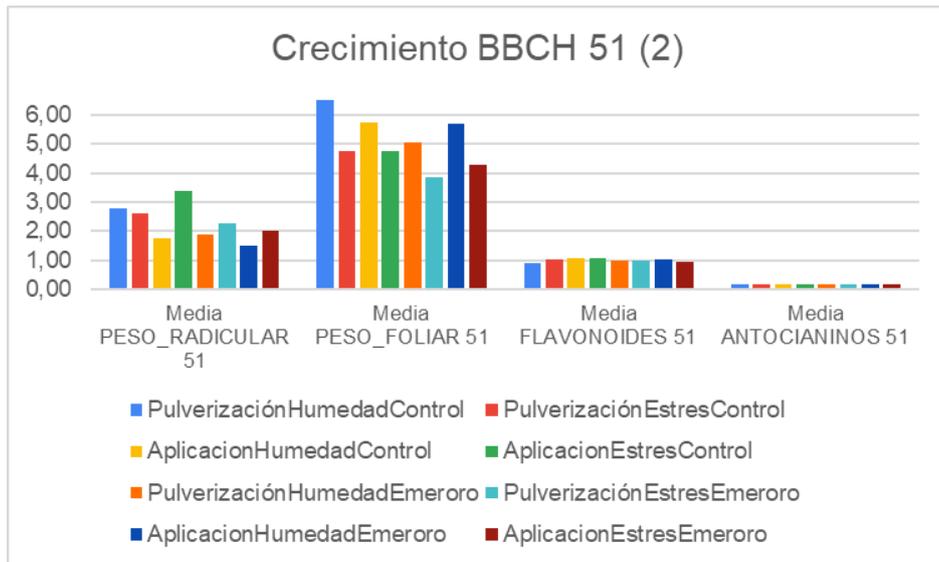


Figura 23.6: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos del estado BBCH 51 (2)

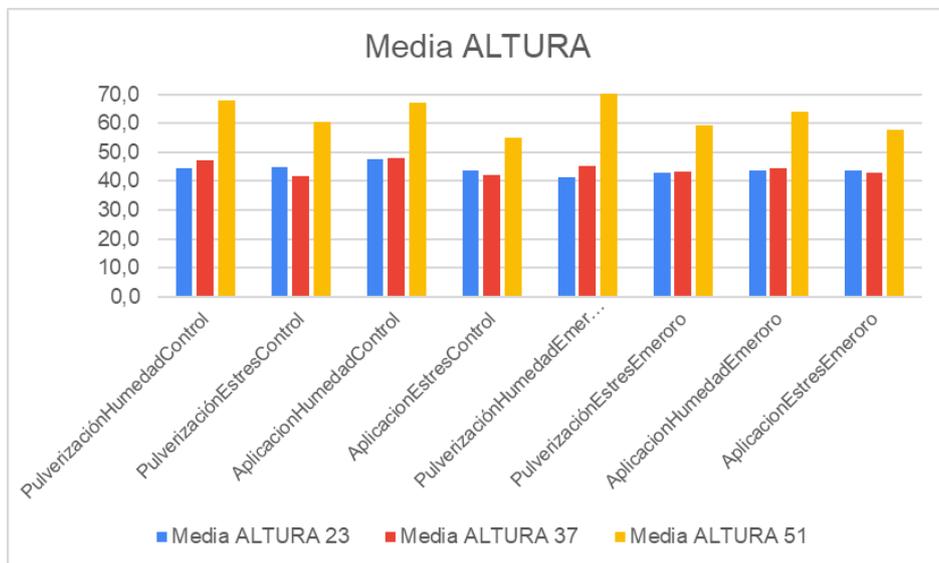


Figura 24.1: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (altura)

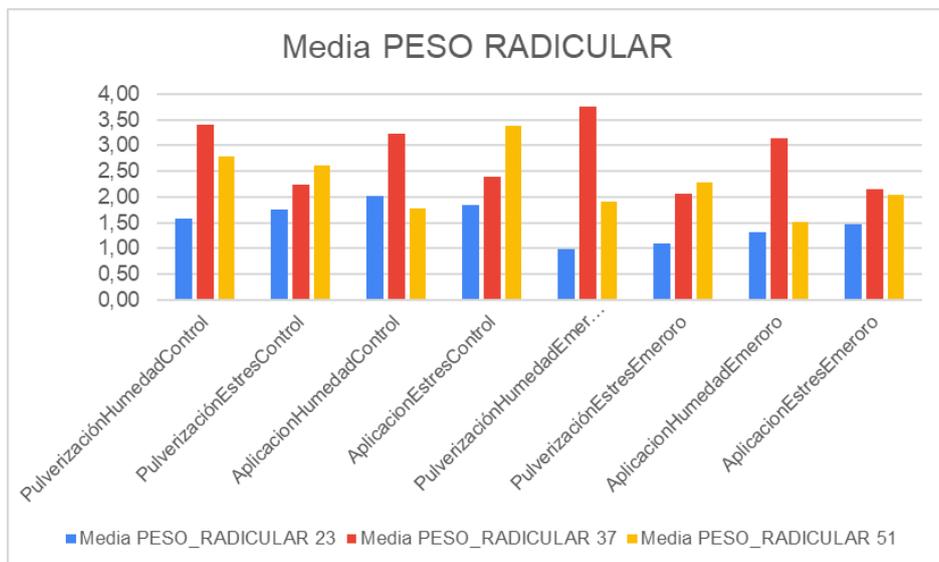


Figura 24.2: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (peso radicular)

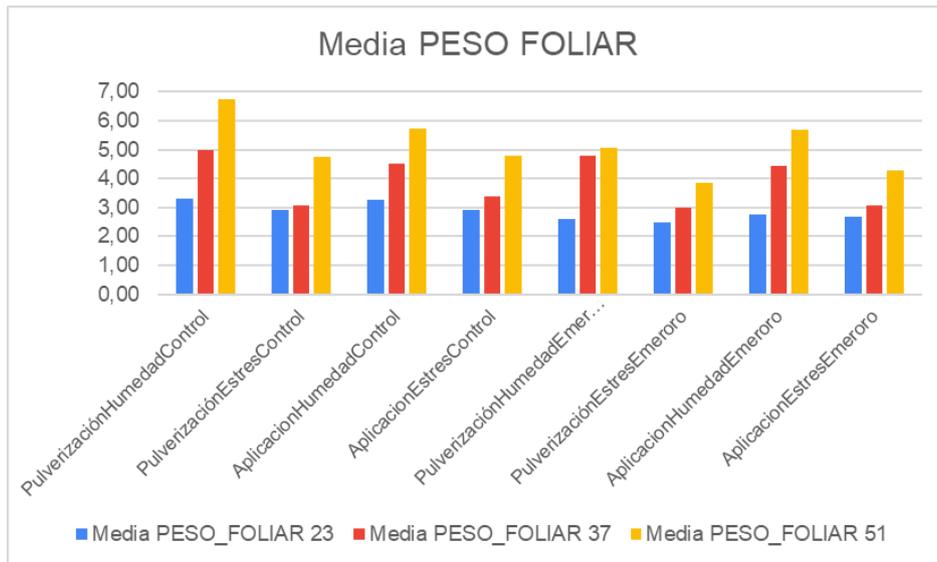


Figura 24.3: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (peso foliar)

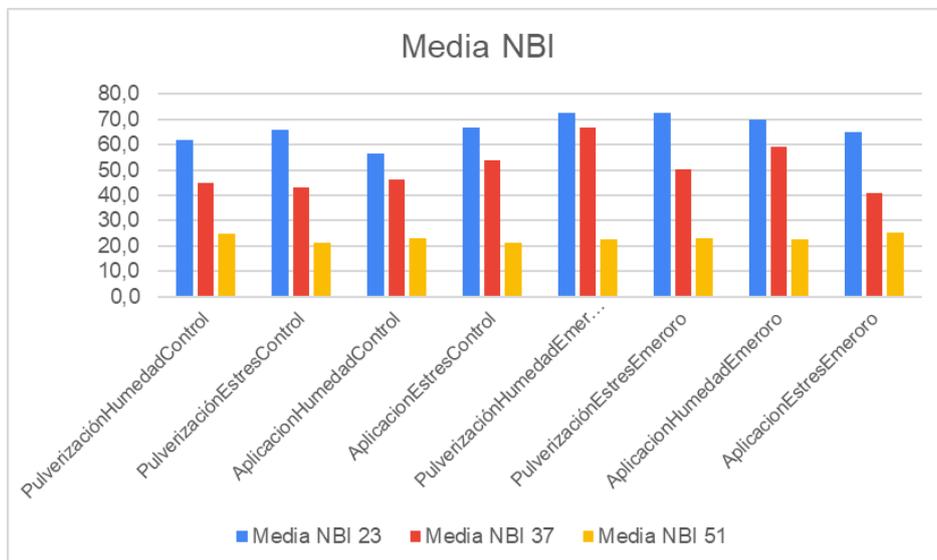


Figura 24.4: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (NBI)

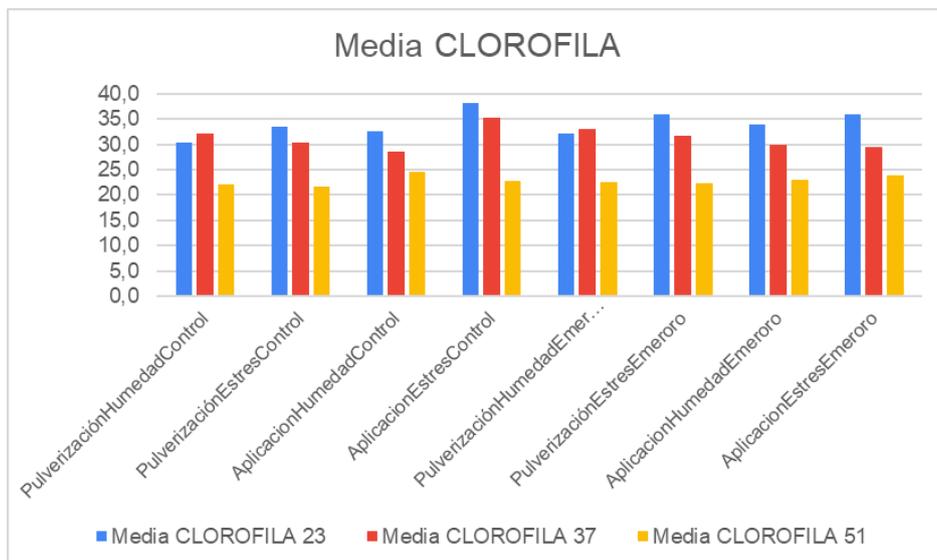


Figura 24.5: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (clorofila)

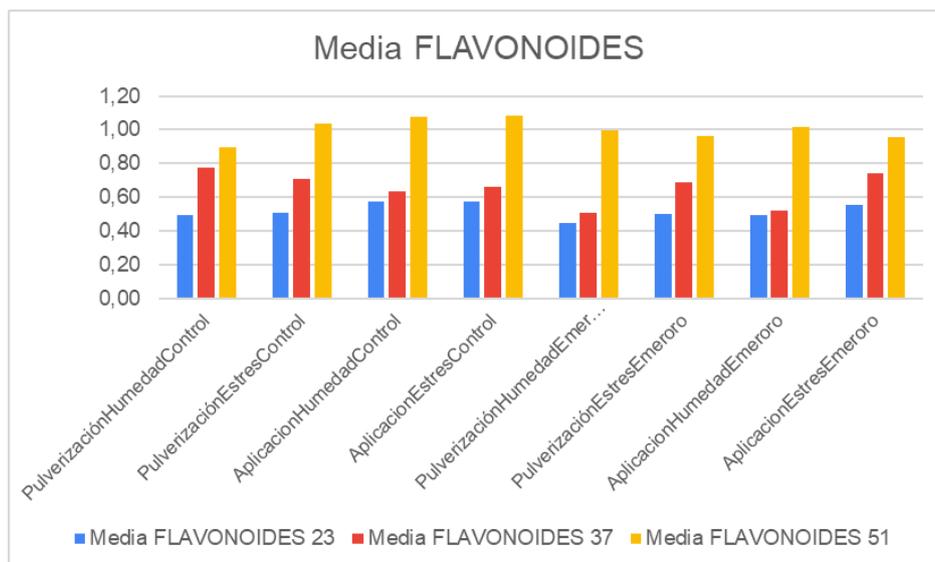


Figura 24.6: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (flavonoides)

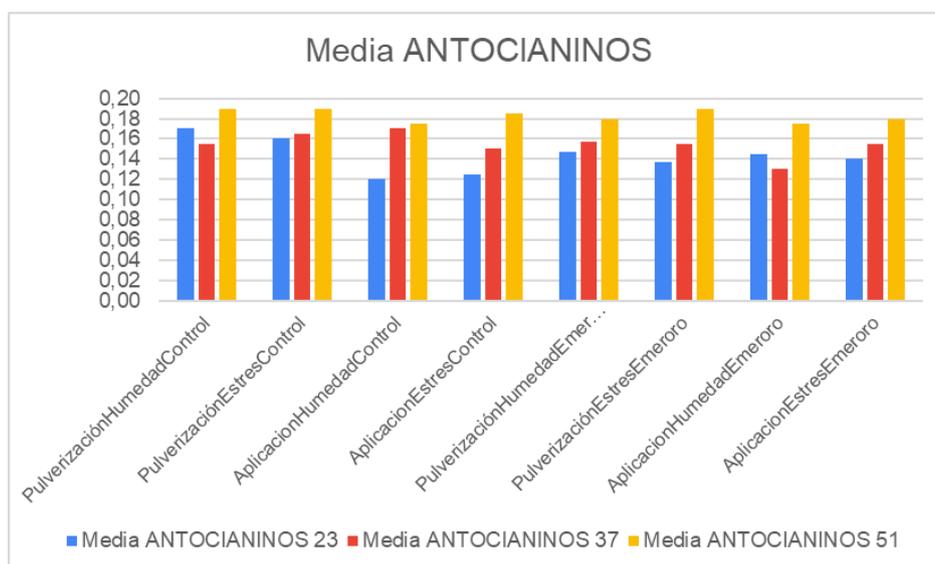


Figura 24.7: Evolución de parámetros morfológicos y fisiológicos (antocianinos)

En el caso de altura, peso radicular y peso foliar, como era de esperar; las diferencias entre humedad y estrés fueron las más notables. Para la altura, aunque similares, los datos de las plantas con producto fueron algo mayores que las de control. Sin embargo, para peso radicular y peso foliar ocurre lo contrario: los controles superaron a las plantas con producto. También cabe destacar que en el peso radicular, en todos los casos de plantas con producto el dato más alto fue el del estado BBCH 37, mientras que en control su evolución fue la que cabía esperar, de menos a más.

Con los datos de NBI y clorofila los datos de plantas con producto fueron mayores que los controles, notándose menos la diferencia entre humedad y estrés. Por último, tanto con flavonoides como con antocianinos, los datos fueron muy similares, con apenas diferencias entre plantas con producto y controles o entre humedad y estrés.

### 5.2.2 Análisis de crecimiento en parcela

En la parcela, los datos referidos a los parámetros morfológicos y fisiológicos únicamente fueron tomados en el estado BBCH 51. Es decir, en este caso solo pueden ser analizados desde el punto de vista de los parámetros, uno por uno siguiendo los estados BBCH. En este caso sí que fueron analizados en R.

Los datos cumplieron normalidad y homogeneidad de varianzas en los casos de altura, peso radicular, clorofila, flavonoides y antocianinos ( $p = 0,914$  y Bartlett's K-squared = 2,074;  $p = 0,698$  y Bartlett's K-squared = 1,054;  $p = 0,849$  y Bartlett's K-squared = 1,302;  $p = 0,7053$  y Bartlett's K-squared = 0,301;  $p = 0,687$  y Bartlett's K-squared = 4,593; respectivamente). Sin embargo, los análisis ANOVAs paramétricos no revelaron diferencias significativas de ningún tipo.

En el caso del peso foliar, los datos mostraron normalidad ( $p = 0,934$ ) pero no homogeneidad de varianzas (Bartlett's K-squared = 15,014). El análisis ANOVA no paramétrico no mostró ninguna diferencia significativa.

Por último, en el caso del NBI los datos no mostraron normalidad ( $p = 0,013$ ) y el análisis ANOVA no paramétrico tampoco reveló diferencias significativas.

Aun así, si los datos son analizados como los de bandejas de alveolos, se puede observar que el producto sí que tuvo un efecto beneficioso en varios aspectos (Figuras 25.1, 25.2, 25.3, 25.4). Los datos de peso radicular, peso foliar, NBI y clorofila fueron notablemente mejores en caso de plantas con producto que en controles.

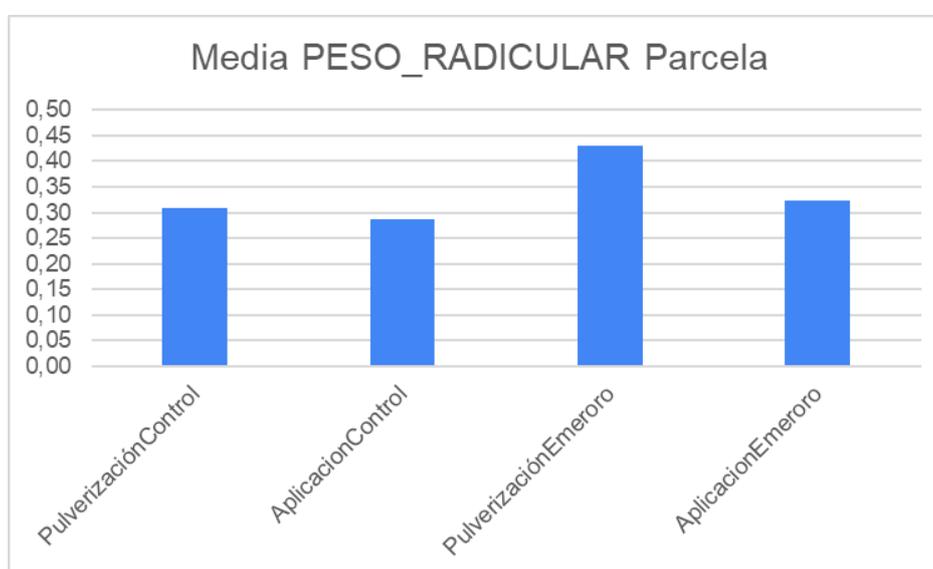


Figura 25.1: Evolución de ciertos parámetros morfológicos y fisiológicos en parcela (peso radicular)

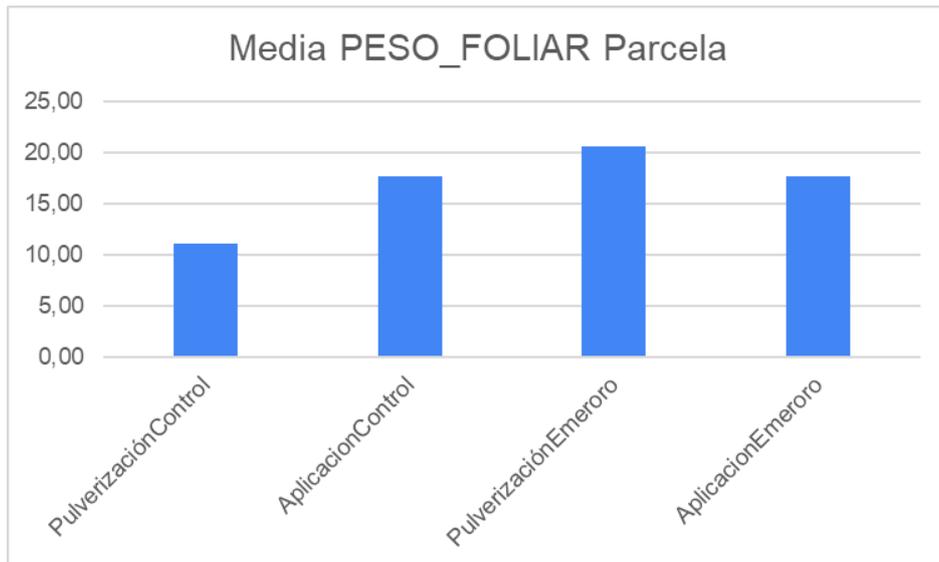


Figura 25.2: Evolución de ciertos parámetros morfológicos y fisiológicos en parcela (peso foliar)

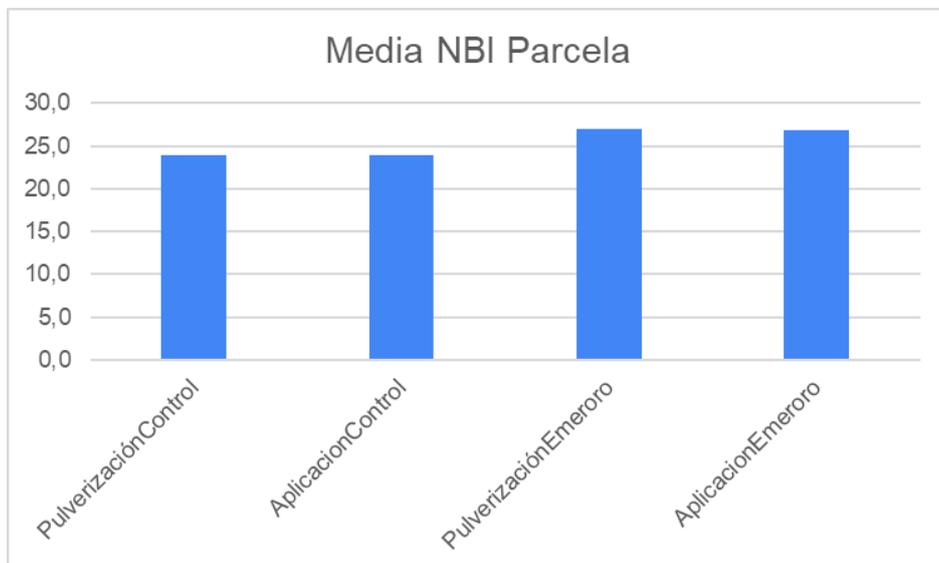


Figura 25.3: Evolución de ciertos parámetros morfológicos y fisiológicos en parcela (NBI)

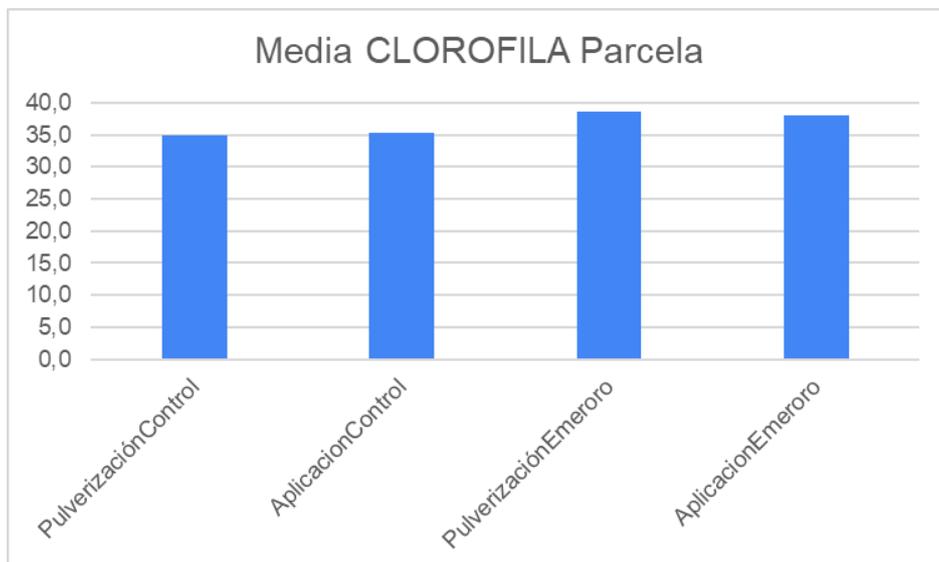


Figura 25.4: Evolución de ciertos parámetros morfológicos y fisiológicos en parcela (clorofila)

### 5.3 Pruebas de producción final

#### 5.3.1 Análisis de producción final en bandeja de alveolos

En caso del peso final, el ANOVA no paramétrico muestra diferencias significativas ( $p = 0,018$ ) en la interacción modo-producto-agua. Los tratamientos que peor funcionaron fueron aquellos de aplicación directa sobre semilla (Figura 26). Además, la media del peso final de la aplicación sobre terreno con humedad de control fue notablemente mayor que la de aplicación sobre semilla con humedad de control, algo que no debería pasar al haber sido tratadas por igual. También se aprecia que en todos los casos con producto la producción fue menor que en su pareja de control.

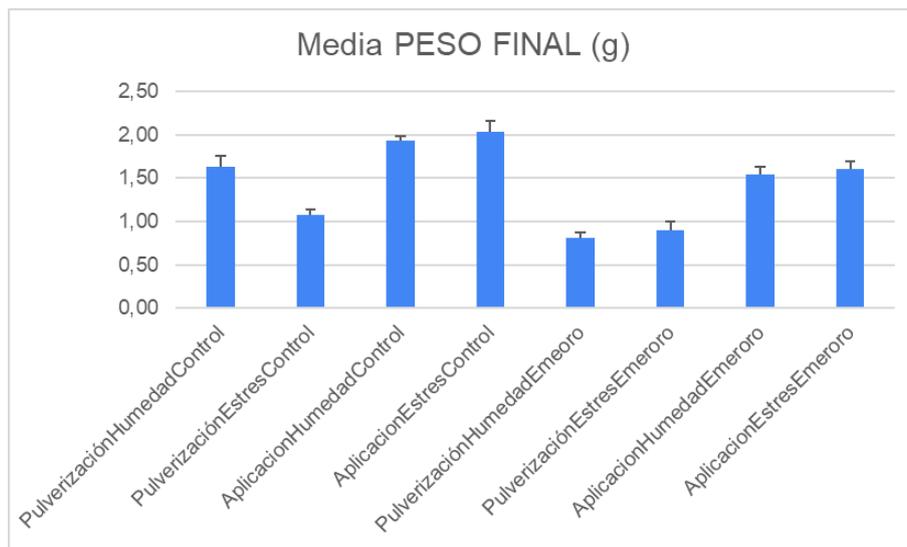


Figura 26: Producción (g) de las bandejas de alveolos

El número de espigas muestra que el uso o no de agua presentó diferencias significativas ( $p = 0,005$ ) y que el uso o no de producto se quedó muy cerca ( $p = 0,066$ ). Se comprueba que con humedad se produjeron más espigas que con estrés; y también que el control produjo más que el producto (Figura 27).

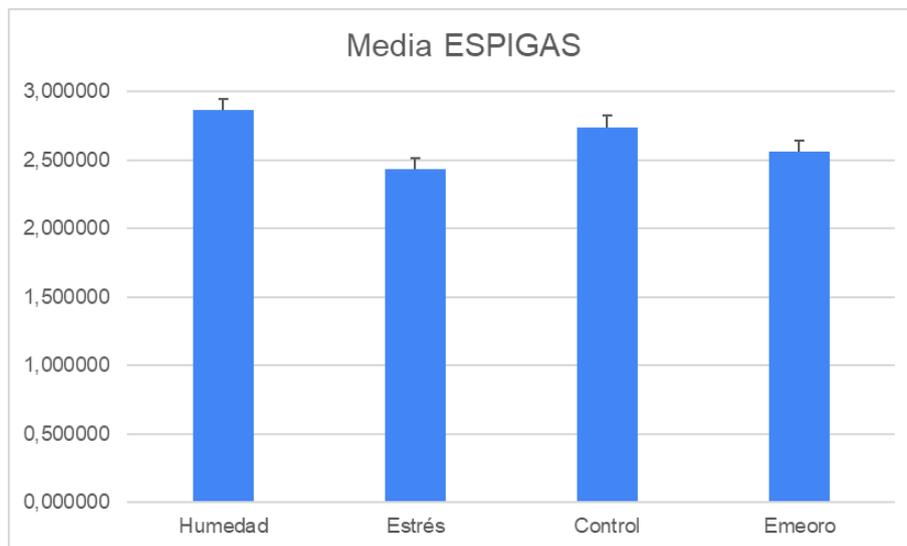


Figura 27: Número de espigas de las bandejas de alveolos

El número de granos por espiga solo presentó diferencias significativas en el uso o no de producto ( $p = 0,01$ ), revelando que el control obtuvo de media más granos que el producto en cualquier caso, ya fuera sobre semilla o sobre terreno o con humedad o estrés (Figura 28).

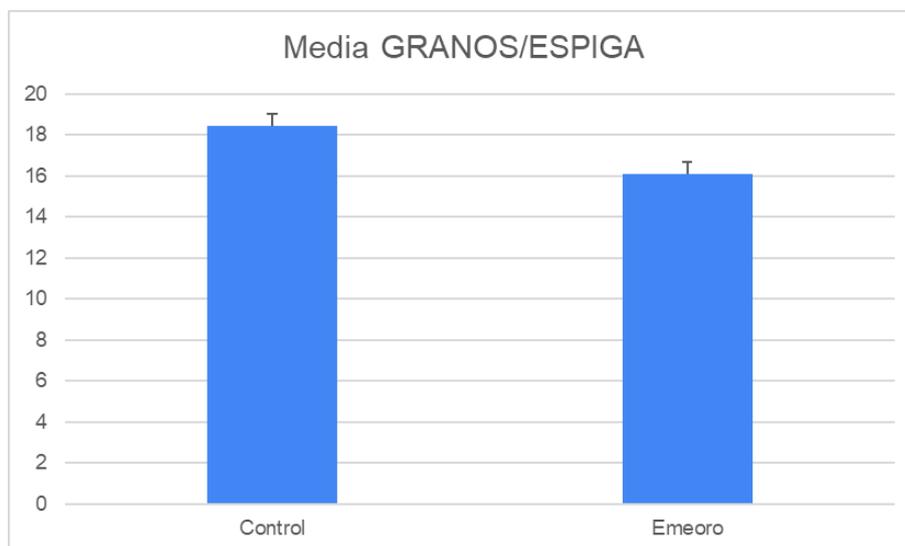


Figura 28: Número de granos/espiga en las bandejas de alveolos

### 5.3.2 Análisis de producción final en parcela

En el caso de producción, el ANOVA paramétrico muestra que no existieron diferencias significativas, por lo que se puede decir que el uso del producto aumentó la producción, pero no significativamente (Figura 29).

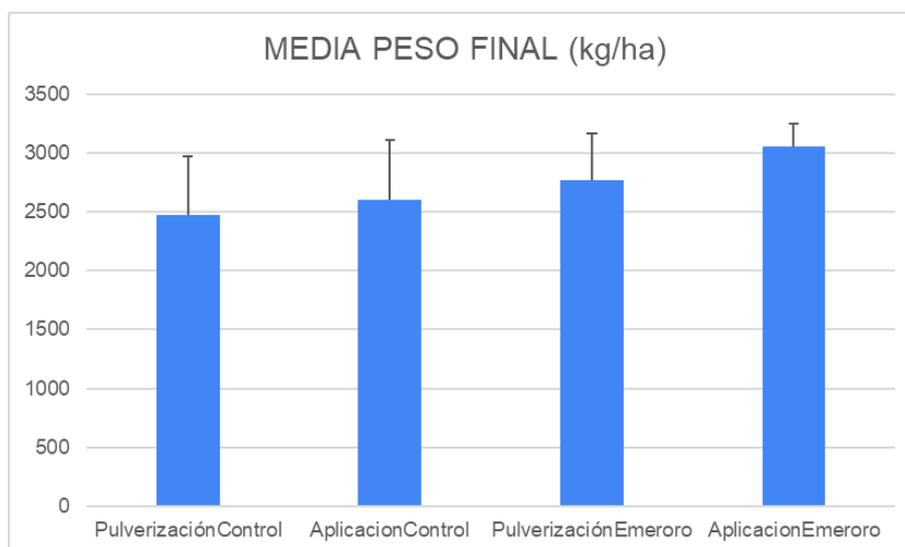


Figura 29: Producción (kg/ha) de la parcela

El número de espigas muestra que el valor relacionado con el uso o no de producto no fue significativo ( $p = 0,0838$ ), aunque se comprueba que su uso significó mayor número de espigas que el control (Figura 30).

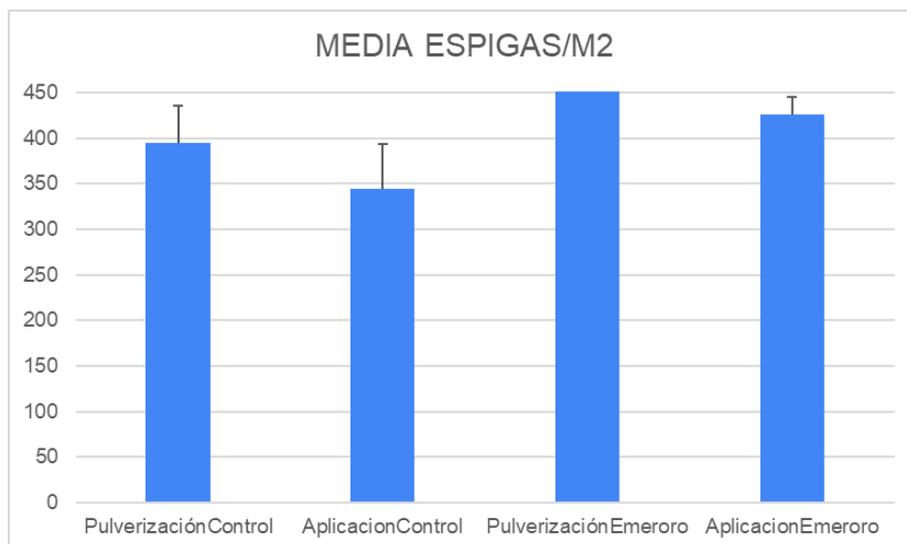


Figura 30: Número de espigas/m<sup>2</sup> en la parcela

El número de granos por espiga tampoco revela ninguna diferencia significativa, debido a que los datos fueron muy similares entre sí. Aun así, los valores fueron levemente más elevados en caso de aplicar el producto directamente sobre la semilla (Figura 31).

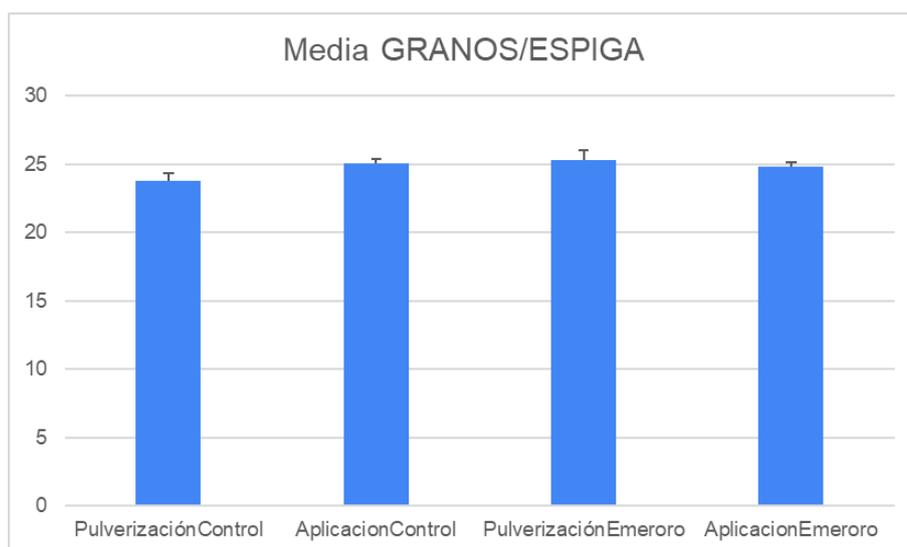


Figura 31: Número de granos/espiga en la parcela

El peso específico del grano muestra que existieron diferencias significativas ( $p = 0,0387$ ) en la interacción modo-producto. Se comprueba que la mayor influencia se encontró en la aplicación sobre terreno frente a la aplicación directa sobre semilla, ya que con el uso de producto alcanzó valores más altos que el control (Figura 32).

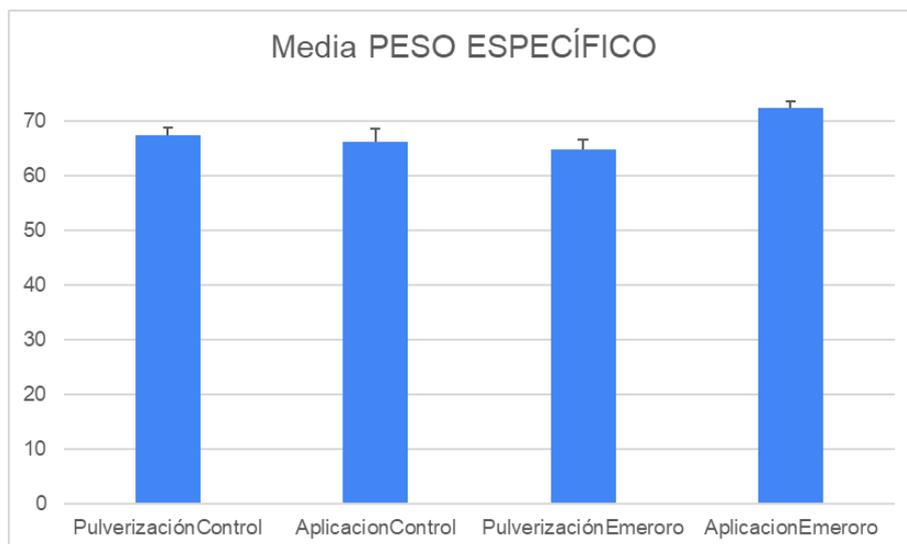


Figura 32: *Peso específico del grano en la parcela*

A continuación, se muestra una comparativa entre los resultados de producción final entre las bandejas de alveolos y la parcela, convertidos a las mismas unidades. Esto permite comprobar que los datos fueron claramente mejores en la parcela frente a las bandejas de alveolos, ya fueran plantas de control o inoculadas. Además, mientras que todos los datos en bandejas fueron inferiores para plantas inoculadas que para plantas de control, en la parcela ocurrió lo contrario: todos los datos de plantas inoculadas mejoraron a los de las plantas de control, a pesar de no hacerlo significativamente (Figuras 33.1, 33.2, 33.3):

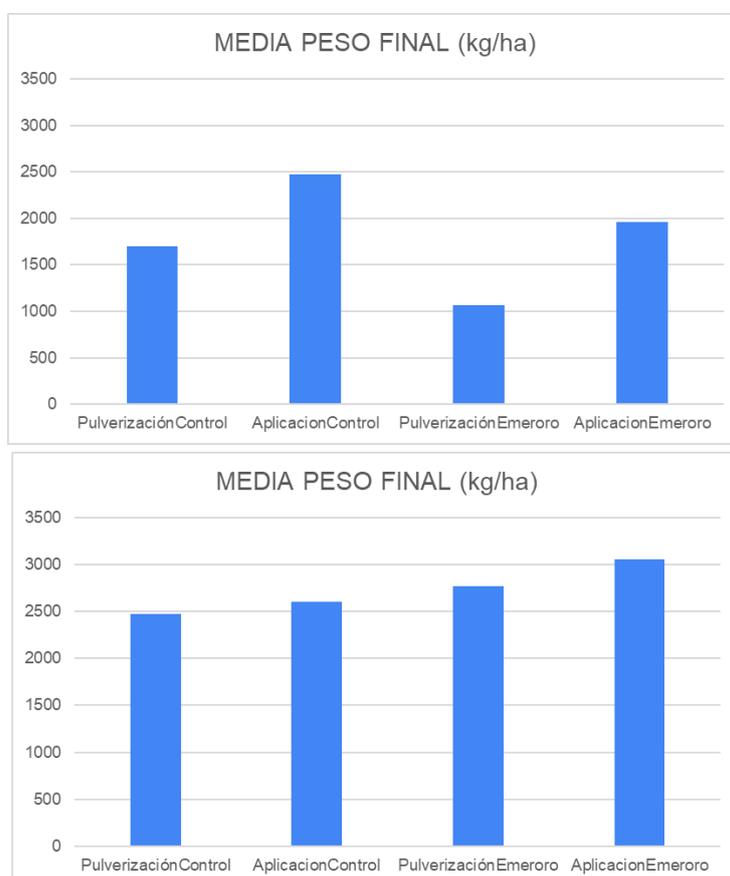


Figura 33.1: Comparativa entre bandejas (arriba) y parcela (abajo): Peso final (kg/ha)

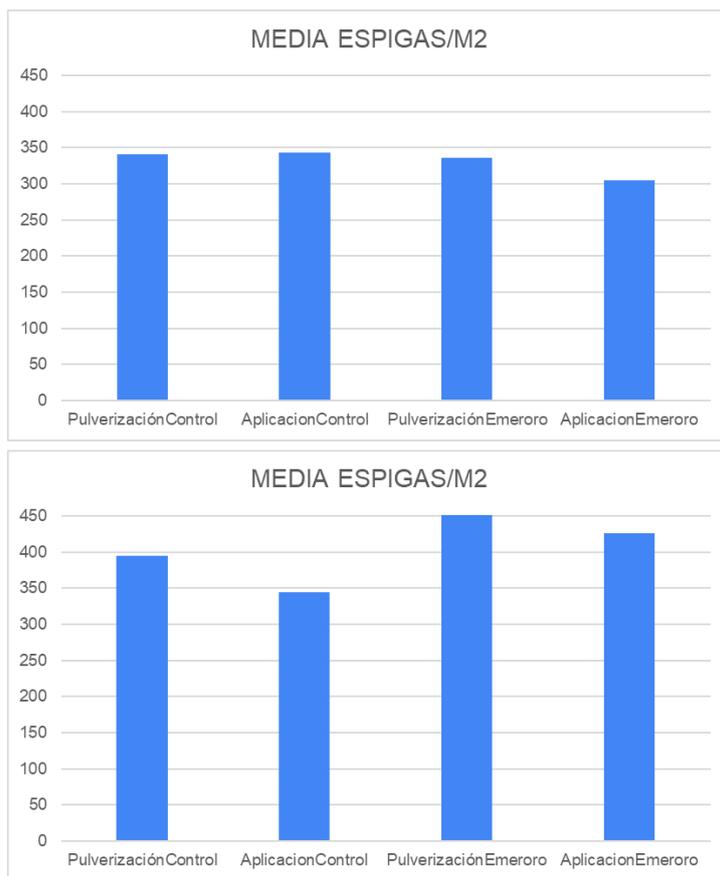


Figura 33.2: Comparativa entre bandejas (arriba) y parcela (abajo): Espigas/m<sup>2</sup>

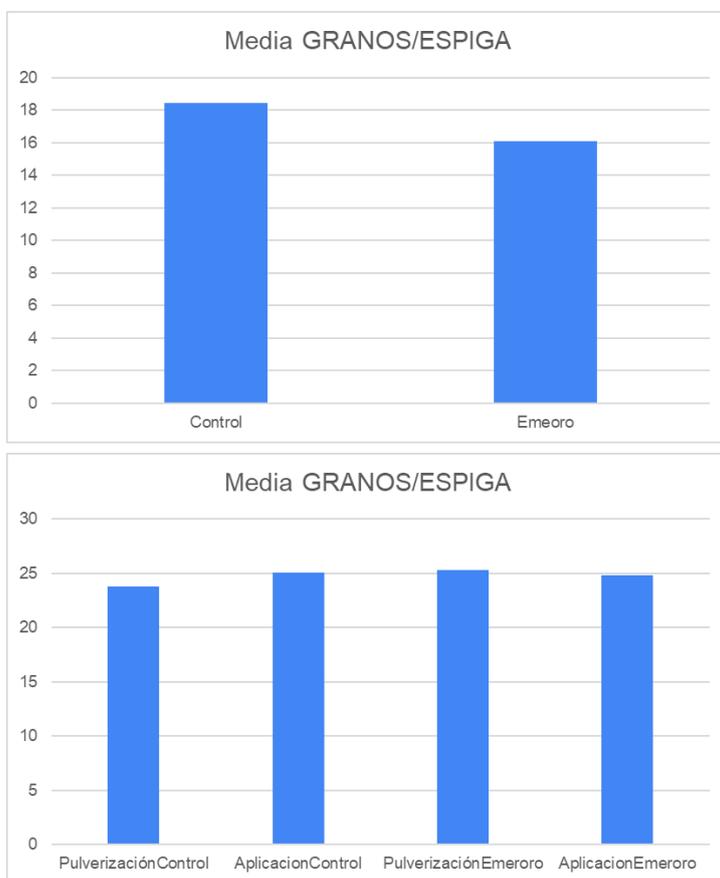


Figura 33.3: Comparativa entre bandejas (arriba) y parcela (abajo): Granos/espiga

## 6 DISCUSIÓN

Las micorrizas arbusculares han sido descritas en numerosos estudios como promotores del crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos. Sin embargo, estos estudios no siempre son realizados en las condiciones en las que posteriormente podrían ser empleados. Es muy difícil conseguir que las condiciones de un invernadero, cámara de cultivo o cualquier otro medio de control lleguen a ser iguales a las ambientales (Jerbi et al., 2022). La razón principal es que las combinaciones de factores externos que se pueden llegar a dar son tan complejas que hacen muy difícil prever los resultados de cada una de ellas, lo que dejan sin resolver muchas cuestiones para que el uso de AMF sea viable en cualquier escenario que se plantee. Es por ello que podría considerarse que los resultados obtenidos en este trabajo no han sido los mismos que en un principio podían esperarse de él. Eso sí, es importante diferenciar entre los obtenidos en bandejas de alveolos (condiciones semi-controladas) y en parcela de experimentación (condiciones ambientales), ya que, aunque pueda parecer contradictorio, en varios casos las plantas de la parcela presentan resultados mejores o más optimistas que las plantas de las bandejas.

Lo primero que se observó, viendo los resultados de micorrización en las bandejas, es que las tasas de colonización más altas de AMF se registraron con los tratamientos de pulverización en semilla. Sin embargo, con los resultados obtenidos, tanto de crecimiento como de producción final, se puede afirmar que la medida en que la inoculación micorrícica fue beneficiosa para las plantas no se correlacionó con la extensión de la colonización micorrícica en las raíces, al igual que ocurrió en el estudio llevado a cabo por Thirkell et al. (2022). También se vio que las plantas micorrizadas mejoraban a las no micorrizadas en la altura de las plantas, pero que, por el contrario, los pesos radicular y foliar de los controles eran mayores que el de las plantas con producto, similar al trabajo de Ould-Amer et al. (2023). Una posible explicación a esta ambigüedad es que la dosis utilizada ha sido la recomendada para cultivos hortícolas (debido a que no hay dosis establecida para cereales), que normalmente son plantas con raíces pivotantes, mientras que las de los cereales son fasciculadas. Además, las micorrizas muestran preferencia por suelos con buena temperatura. Sin embargo, en algunos casos, si esta temperatura llega a ser excesivamente alta, las características de las micorrizas pueden llegar a ser peores que al crecer en suelos con temperatura ambiente (Grey, 1991). Esto afirma que cada especie de *Glomus* presenta una determinada tolerancia a la temperatura en la que tengan lugar su inoculación y desarrollo. Por tanto, puede que los malos resultados obtenidos en bandejas de alveolos tengan relación con haber sufrido calor excesivo en un momento concreto de su desarrollo, justo antes de ser desplazadas del invernadero al exterior.

Mientras tanto, en los resultados de micorrización en parcela de experimentación no se apreciaron diferencias significativas, excepto la que tuvo lugar entre los controles de semilla y de terreno. No fue nada importante, ya que probablemente se debiera a la situación de las parcelas de aplicación directa sobre semilla, situadas próximas a las de aplicación sobre terreno; y el viento pudo dispersar algo el producto provocando que alguna parcela sufriera contaminación. Esto significa que la colonización ha tenido lugar

con solo una pulverización, ya sea sobre la semilla o sobre el terreno (en este caso dos). Por tanto, se podría pensar que el producto podría funcionar sin problemas utilizando el “coating” más adecuado (como se indicó al principio del trabajo, ver sección 4.3.1), o mediante el uso de un equipo de aplicación profesional durante el desarrollo del cultivo. Es decir, según estos datos, el agricultor tiene libertad de elegir cuándo aplicar el producto: pre-siembra (semilla) o post-siembra (terreno). Sin embargo, para confirmar estos resultados, resulta necesaria investigación más concreta que permita salir de dudas.

Algo llamativo en las plantas de bandejas de alveolos es que cuando se encontraban en estado BBCH 21, aquellas que habían recibido producto (ya fuera aplicado directamente sobre la semilla o bien sobre el terreno), mostraban una clara depresión en comparación con los controles. También se apreciaba un estado más vigoroso en las plantas de control que en las plantas inoculadas en estado BBCH 37. Eso sí, las diferencias más notables comenzaron a observarse a partir del estado BBCH 51, llegando a darse diferencias entre plantas con producto y plantas de control de hasta dos semanas al llegar el momento de la cosecha. Estas diferencias a lo largo del ciclo fueron más notables aún en caso de comparar plantas en régimen de humedad con plantas en régimen de estrés hídrico, lo que muestra que el empleo de AMF no ha tenido los efectos esperados en la cebada en las situaciones de estrés por sequía, como tuvo lugar en los resultados de Jerbi et al. (2022). Sin embargo, hay que recordar que algunas especies fúngicas son capaces de adaptarse mejor a las condiciones de déficit hídrico que otras (Ashraf et al., 2010), lo que hace pensar que es posible que las especies de *Glomus* utilizadas en este trabajo no sean las más adecuadas para ello.

En realidad, las diferencias de crecimiento a lo largo del ciclo entre plantas inoculadas y no inoculadas no son demasiado sorprendentes, ya que se sabe que el empleo de micorrizas en cebada hace que su crecimiento se vea retrasado (Grace et al., 2009). Sin embargo, no está claro el porqué de este hecho, ya que las especies y aislados de hongos micorrícicos tienen efectos muy variables sobre la nutrición y el crecimiento de las plantas (Mensah et al., 2015; Watts-Williams et al., 2019). Puede que una de las razones sea que los cultivares de cereal modernos, como ocurre en este trabajo con Planet, tengan mejor rendimiento que sus antepasados o precedentes salvajes en estado no micorrícico (Janos, 2007; Sawers et al., 2008), por lo que cabe la posibilidad de que su capacidad de respuesta micorrícica en el rendimiento o en la nutrición se vea reducida. Además, en relación con los cultivares de cebada, cada uno tiene una susceptibilidad concreta frente a las diferentes especies de *Glomus*, por lo que una especie particular de AMF puede ser muy eficaz para mejorar el crecimiento y rendimiento de un cultivar concreto, pero no ser así en otro cultivar distinto (Boyetchko y Tewari, 1995). Es decir, puede que no se hayan utilizado las combinaciones apropiadas planta-hongo. Por consiguiente, se necesitan más investigaciones para evaluar las diversas relaciones entre las especies de AMF y los cultivares de cebada, su potencial de inoculación y su eficacia.

Por último, los resultados obtenidos en parcela, tanto los de crecimiento como los de producción final, sí que corroboran estudios anteriores que determinaron que el empleo de AMF aumentaba los datos evaluados en las plantas (Armada et al., 2015; Xiao et al.,

2019). Un posible motivo, además de los ya mencionados anteriormente (temperatura, humedad, etc.) es la diferencia en el suelo utilizado en cada caso, ya que las prácticas agronómicas pueden provocar cambios beneficiosos en la composición de la comunidad de AMF en suelos arables (Thirkell et al., 2021).

Al comienzo de la discusión se hablaba de las posibles combinaciones que podían tener lugar en el exterior. Pues bien, en este trabajo han sido comentadas varias, como la diferente adaptación de los distintos cultivares de cebada a distintas especies de AMF, la adaptación de las especies de AMF a las condiciones que vayan a ser empleadas (en este caso estrés hídrico o no), o la facilidad de colonización de las especies de AMF en función de cuál sea la temperatura del suelo. En resumen, parece claro que la investigación sobre la eficacia de estos hongos en campo es necesaria, ya que, al menos en el caso de los cereales, es donde más adelante va a ser llevado a cabo su uso. Además, es muy importante conocer la caracterización de cómo las micorrizas arbusculares pueden influir en cada uno de los rasgos de las plantas y viceversa. Se trata de una importante tarea, de cara a conseguir que los beneficios que aportan estos hongos no se vean frenados por otros factores que a día de hoy se desconocen.

## 7 CONCLUSIONES

1. Los AMF del producto Emeoro MixQAP sí que son capaces de micorrizar en cultivo en extensivo, en este caso en cereal (cebada).
2. La micorrización tiene lugar tanto si la aplicación se lleva a cabo de forma previa a la siembra en semilla como después de la siembra en el terreno. El éxito de micorrización es similar de ambos modos, por lo que en cada caso habría que valorar si se prefiere hacer antes o después de la siembra.
3. El empleo del producto supone un retraso del ciclo en el cultivo, lo que hay que tener en cuenta a la hora de su siembra y resto de labores.
4. La micorrización tiene lugar tanto en condiciones de humedad como de estrés hídrico. Sin embargo, no se pudieron observar diferencias significativas entre tratamientos y controles, debido a las razones explicadas anteriormente.
5. Los resultados son mejores en el caso de la parcela, tanto aquellos relacionados con el desarrollo del cultivo como los relacionados con la producción final. El peso final en parcela es mayor con una diferencia de unos 300kg en caso de aplicar el producto.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- AEA (Anuario de Estadística Agroalimentaria) (2021) Superficie y Producciones de Cultivos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. Disponible en <<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>> [consulta: agosto 2024].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2020) Presentación de la Estrategia “De la Granja a la Mesa”. Disponible en <[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2020/Presentacion\\_Estrategia\\_de\\_la\\_Granja\\_a\\_la\\_mesa.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2020/Presentacion_Estrategia_de_la_Granja_a_la_mesa.pdf)> [consulta: enero 2024].
- AgriExpo (AgriExpoConnect) (2024) Analizador de hojas DUALEX®. Disponible en <<https://www.agriexpo.online/es/prod/force/product-175259-63301.html>> [consulta: agosto 2024].
- Alonso-Alija, C. (2024). Innovación para una agricultura sostenible. *Phytoma* 360, Junio-Julio 2024.
- Armada, E.; Azcon, R.; Lopez-Castillo, O.M.; Calvo-Polanco, M.; Ruiz-Lozano, J.M. (2015). Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 90, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>.
- Artursson, V.; Finlay, R.D.; Jansson, J.K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>.
- Ashraf, M.; Ozturk, M.; Ahmad, M.S.A. (2010) *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Primera Edición. Ed. Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7>.
- Asim, S.; Hussain, A.; Murad, W.; Hamayun, M.; Iqbal, A.; Rehman, H.; Tawab, A.; Irshad, M.; Alataway, A.; Dewidar, A.Z.; Elansary, H.O.; Lee, I. (2022). Endophytic *Fusarium oxysporum* GW controlling weed and an effective biostimulant for wheat growth. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.922343>.
- Barea, J.M.; Pozo, M.J.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417), 1761-1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri197>.

- Baron, N. C.; Rigobelo, E. C. (2021). Endophytic fungi: A tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology* 13 (1), 39-55. <https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>.
- Basiru, S.; Mwanza, H.P.; Hijri, M. (2021). Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculant Benchmarks. *Microorganisms* 9 (81), 1-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010081>.
- Beltrán-Pineda, M.E.; Bernal-Figueroa, A.A. (2022). Biofertilizantes: alternativa biotecnológica para los agroecosistemas. *Mutis* 12 (1), 1-18. <https://doi.org/10.21789/22561498.1771>.
- Bonciarelli, F. (1976) *Agronomía*. Ed. Edagricole, Milán, Italia.
- Bonfante, P.; Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1 (48). <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>.
- Boyetchko, S.M.; Tewari J.P. (1995). Susceptibility of barley cultivars to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Plant Science* 75 (1), 269-275. <https://doi.org/10.4141/cjps95-048>.
- Brundrett, M.C.; Abbott, L.K. (2002). Arbuscular mycorrhizas in plant communities. En: Sivasithamparama, K.; Dixon, K.W.; Barrett, R.L. *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*. Springer Dordrecht, 151-193. [https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9\\_6](https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_6).
- Carrillo-Saucedo, S.M.; Puente-Rivera, J.; Montes-Recinas, S.; Cruz-Ortega, R. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta Botánica Mexicana* 129, 1-27. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1932>.
- Chaudhary, T.; Dixit, M.; Gera, R.; Kumar-Shukla, A.; Prakash, A.; Gupta, G.; Shukla, P. (2020). Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech* 10, 199. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9>.
- Chitnis, V.R.; Suryanarayanan, T.S.; Nataraja, K.N.; Prasad, S.R.; Oelmüller, R.; Shaanker, R.U. (2020). Fungal Endophyte-Mediated Crop Improvement: The Way Ahead. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.561007>.
- Delaeter, M.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Lounès-Hadj-Sahraoui, A. (2024). Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Biostimulant and Biocontrol Agents: A Review. *Microorganisms* 12, 1281. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071281>.

- Di Martino, C.; Torino, V.; Minotti, P.; Pietrantonio, L.; Del Grosso, C.; Palmieri, D.; Palumbo, G.; Crawford, T.W., Jr.; Carfagna, S. (2022). Mycorrhized Wheat Plants and Nitrogen Assimilation in Coexistence and Antagonism with Spontaneous Colonization of Pathogenic and Saprophytic Fungi in a Soil of Low Fertility. *Plants* 11 (7), 924. <https://doi.org/10.3390/plants11070924>.
- Elliott, A.J.; Daniell, T.J.; Cameron, D.D.; Field, K.J. (2021). A commercial arbuscular mycorrhizal inoculum increases root colonization across wheat cultivars but does not increase assimilation of mycorrhiza-acquired nutrients. *Plants People Planet*, Sep 3 (5), 588-599. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10094>.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2022) FAOSTAT. Estadísticas agrarias: datos de cultivos. Disponible en <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/OCL>> [consulta: agosto 2024].
- Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 8 (2), 175-183.
- Fombellida-Villafuela, A. (1999) *Anejos de cultivos herbáceos extensivos*. Palencia, Universidad de Valladolid.
- García, J.M.; Pozo, M.J.; López-Ráez, J.A. (2020). Histochemical and Molecular Quantification of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis. En: Rodríguez-Concepción, M.; Welsch, R. *Plant and Food Carotenoids*. Methods in Molecular Biology 2083, 293-299. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9952-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9952-1_22).
- García-Pérez, A. (2010) *Estadística básica con R*. Primera edición.
- Garmendia, I.; Gogorcena, Y.; Aranjuelo, I.; Goicoechea, N. (2017). Responsiveness of Durum Wheat to Mycorrhizal Inoculation Under Different Environmental Scenarios. *Journal of Plant Growth Regulation* 36, 855-867. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9690-x>.
- Giovannetti, M.; Mosse, B. (1980). An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *The New Phytologist*, 84 (3), 489-500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.
- Grace, E.J.; Cotsaftis, O.; Tester, M.; Smith, F.A.; Smith, S.E. (2009). Arbuscular mycorrhizal inhibition of growth in barley cannot be attributed to extent of colonization, fungal phosphorus uptake or effects on expression of plant phosphate transporter genes. *New Phytologist* 181 (4), 938-949. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02720.x>.
- Grey, W.E. (1991). Influence of temperature on colonization of spring barleys by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 137, 181-190. <https://doi.org/10.1007/BF00011196>.

- Guerrero-García, A. (1999) *Cultivos herbáceos extensivos*. Sexta edición. Ed. MundiPrensa, Madrid.
- Igiehon, N.; Babalola, O. (2017). Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 4871-4881. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z>.
- Janos, D.P. (2007). Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17, 75-91. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0094-1>.
- Jerbi, M.; Labidi, S.; Laruelle, F.; Tisserant, B.; Dalpé, Y.; Lounès-Hadj-Sahraoui, A.; Ben-Jeddi, F. (2022). Contribution of Native and Exotic Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Improving the Physiological and Biochemical Response of Hulless Barley (*Hordeum vulgare* ssp. *nudum* L.) to Drought. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 22, 2187-2204. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00802-2>.
- Jhariya, M.K.; Banerjee, A.; Meena, R.S.; Yadav, D.K. (2019) *Sustainable Agriculture, Forest and Environmental Management*. Primera edición. Ed. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6830-1>.
- Kopittke, P.M.; Menzies, N.W.; Wang, P.; McKenna, B.A.; Lombi, E. (2019). Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>.
- Lanfranco, L.; Bonfante, P.; Genre, A. (2016). The Mutualistic Interaction between Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4 (6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0012-2016>.
- Latz, M. A.; Jensen, B.; Collinge, D. B.; Jørgensen, H. J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology and Diversity* 11, 555-567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>.
- Mair, P.; Wilcox, R. (2020). Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behavior Research Methods* 52, 464-488. <https://doi.org/10.3758/s13428-019-01246-w>.
- Mensah, J.A.; Koch, A.M.; Antunes, P.M.; Kiers, E.T.; Hart, M.; Bücking, H. (2015). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza* 25, 533-546. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0631-x>.
- Mironiuk, M.; Izydorczyk, G. (2022). Toward increasing efficiency of fertilization. En: *Smart Agrochemicals for Sustainable Agriculture*. Academic Press, 139-162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817036-6.00005-4>.

- Molina-Cano, J.L.; García del Moral, L.F. (1989) *La cebada: Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Servicio de Extensión Agraria.
- Murphy, B. R.; Doohan, F. M.; Hodkinson, T. R. (2018). From concept to commerce: developing a successful fungal endophyte inoculant for agricultural crops. *Journal of Fungi* 4 (1), 24. <https://doi.org/10.3390/jof4010024>.
- Ould-Amer, S.; Aliat, T.; Kucher, D.E.; Bensaci, O.A.; Rebouh, N.Y. (2023). Investigating the Potential of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Mitigating Water Deficit Effects on Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agriculture* 13, 552. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030552>.
- Pina, A.; Cristóbal, N.; Pérez-Rodríguez, Y.; Pérez Armas, R. (2018) *Métodos biológicos para una agricultura sostenible*. Ed. Universo Sur, Cienfuegos, Cuba.
- PN-73/R-74007:1973. *Cereal grain - Determination of bulk density*.
- Ponce-Molina, L.; Noroña, P.; Campaña, D.; Garófalo, J.; Coronel, J.; Jiménez, C.; Cruz, E. (2019) *La Cebada (Hordeum vulgare L.): Generalidades y variedades mejoradas para la Sierra ecuatoriana*. Primera edición, Manual n° 116. INIAP, Programa de Cereales, Estación Experimental Santa Catalina, Quito, Ecuador.
- Poveda, J.; Baptista, P. (2021). Filamentous fungi as biocontrol agents in olive (*Olea europaea* L.) diseases: Mycorrhizal and endophytic fungi. *Crop Protection* 146. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105672>.
- Poveda, J.; Eugui, D. (2022). Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agricultura. *Biological Control* 176. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105100>.
- Poveda, J.; Eugui, D.; Velasco, P. (2020). Natural control of plant pathogens through glucosinolates: An effective strategy against fungi and oomycetes. *Phytochemistry Reviews* 19, 1045-1059. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09699-0>.
- Qiu, Z.; Egidi, E.; Liu, H.; Kaur, S.; Singh, B.K. (2019). New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnology Advances* 37. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.010>.
- RAE (Real Academia Española) (2024) Diccionario de la Lengua Española. Disponible en <<https://dle.rae.es/agro>> [consulta: agosto 2024].
- RAE (Real Academia Española) (2024) Diccionario de la Lengua Española. Disponible en <<https://dle.rae.es/-cultura>> [consulta: agosto 2024].

- Ramankutty, N.; Mehrabi, Z.; Waha, K.; Jarvis, L.; Kremen, C.; Herrero, M.; Rieseberg, L.H. (2018). Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. *Annual Review of Plant Biology* 69, 789-815. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040256>.
- Reglamento (UE) 2021/1119, de 30 de junio, por el que se establece el marco para lograr la neutralidad climática y se modifican los Reglamentos (CE) nº 401/2009 y (UE) 2018/1999 («Legislación europea sobre el clima»).
- Reglamento (UE) 2021/550, de 14 de julio, sobre el “Objetivo 55”: Cumplimiento del objetivo climático de la UE para 2030 en el camino hacia la neutralidad climática.
- REICHHARDT (Reichhardt Electronic Innovations) (2024) MINIBATT+ brushless, the smallest combine in the world. Disponible en <<https://www.reichhardt.com/en/all-products/minibatt/>> [consulta: agosto 2024].
- Roberts, D.P.; Mattoo, A.K.; (2018). Sustainable Agriculture-Enhancing environmental benefits, food nutritional quality and building crop resilience to abiotic and biotic stresses. *Agriculture* 8 (1), 8. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010008>.
- Sawers, R.J.H.; Gutjahr, C.; Paszkowski, U. (2008). Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends in Plant Science* 13 (2), 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.006>.
- Stephens, L.R.; Milne, L.; Hawkins, P.T. (2008). Moving towards a Better Understanding of Chemotaxis. *Current Biology* 18 (11), 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.048>.
- Thirkell, T.J.; Campbell, M.; Driver, J.; Pastok, D.; Merry, B.; Field, K.J. (2021). Cultivar-dependent increases in mycorrhizal nutrient acquisition by barley in response to elevated CO<sub>2</sub>. *Plants, People, Planet* 3 (5), 553-566. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10174>.
- Thirkell, T.J.; Grimmer, M.; James, L.; Pastok, D.; Allary, T.; Elliott, A.; Paveley, N.; Daniell, T.; Field, K.J. (2022). Variation in mycorrhizal growth response among a spring wheat mapping population shows potential to breed for symbiotic benefit. *Food and Energy Security*, 11 (2), e370. <https://doi.org/10.1002/fes3.370>.
- Tyagi, J.; Chaudhary, P.; Mishra, A.; Khatwani, M.; Dey, S.; Varma, A. (2022). Role of Endophytes in Abiotic Stress Tolerance: With Special Emphasis on *Serendipita indica*. *International Journal of Environmental Research* 16, 62. <https://doi.org/10.1007/s41742-022-00439-0>.
- Varga, B.; Vida, G.; Varga-László, E.; Bencze, S.; Veisz, O. (2015). Effect of Simulating Drought in Various Phenophases on the Water Use Efficiency of Winter Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201. <https://doi.org/10.1111/jac.12087>.

- Verma, M; Mishra, J.; Arora, N.K. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Diversity and Applications. En: Sobti, R.; Arora, N.; Kothari, R. *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. Springer Singapore, 129-173. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_6).
- Villalobos-Martín, F.J.; Fereres-Castiel, E. (2019) *Fitotecnia: principios de agronomía para una agricultura sostenible*. Ed. MundiPrensa.
- Watts-Williams, S.J.; Emmett, B.D.; Levesque-Tremblay, V.; MacLean, A.M.; Sun, X.; Satterlee, J.W.; Fei, Z.; Harrison, M.J. (2019). Diverse *Sorghum bicolor* accessions show marked variation in growth and transcriptional responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant, Cell & Environment* 42 (5), 1758-1774. <https://doi.org/10.1111/pce.13509>.
- Witzenberger, A.; Lancashire, D. (2001) Codificación BBCH de los estadios fenológicos de desarrollo de los cereales. En: Meier, U. *BBCH Monografía-Estadios de las plantas mono- y dicotiledóneas*. Segunda Edición. Centro Federal de Investigaciones Biológicas para Agricultura y Silvicultura, 14-18.
- Xiao, D.; Che, R.; Liu, X.; Tan, Y.; Yang, R.; Zhang, W.; He, X.; Xu, Z.; Wang, K. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi abundance was sensitive to nitrogen addition but diversity was sensitive to phosphorus addition in karst ecosystems. *Biology and Fertility of Soils* 55, 457–469. <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01362-x>.