



ANEXO

Título del proyecto: Análisis de la implementación y evolución de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam) micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en el marco del proyecto "I+DeheSa" desarrollado en la Finca de Castro Enríquez de la Diputación de Salamanca.

Duración: Cinco anualidades 2014-2019

Investigador principal: Dr. Ignacio Santa-Regina Rodríguez

Organismo solicitante: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

Participantes: Dr. Mariano Igual Arroyo

Dr. Álvaro Peix Geldart

Palabras clave: Interacciones beneficiosas planta-microorganismo, Simbiosis micorrícica, PGPR, Biodiversidad Microbiana, Dinámica biogeoquímica, *Quercus rotundifolia*, *Tuber melanosporum*.

INTRODUCCIÓN

Mediante resolución de 22 de junio de 2011, de la Secretaría de Estado de Cooperación Territorial (BOE nº 156, de 1 de julio de 2011) fue resuelta la convocatoria 2011 de ayudas del Fondo Europeo de Desarrollo Regional para cofinanciar proyectos de desarrollo local y urbano durante el período de intervención 2007-2013. En virtud de dicha resolución, se concedió una ayuda a la Diputación de Salamanca para la realización del proyecto denominado "I+DeheSa", incluido dentro del Programa operativo de Castilla y León con el código CL6.

A raíz de esta concesión se han establecido conversaciones entre la Excm. Diputación de Salamanca y el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con el fin de implementar un proyecto de investigación, en el marco del cual el IRNASA-CSIC propone realizar el proyecto arriba mencionado, cuyo objetivo es la obtención de trufa, su seguimiento y el estudio de las posibilidades que dicho cultivo puede tener como alternativa en zonas desfavorecidas, parcelas con menor valor para otros aprovechamientos, e impulsor de una repoblación forestal con especies autóctonas de forma rentable y posible alternativa productiva, añadiendo un valor económico en las zonas adhesadas.

Entre los bienes ecosistémicos con un interés económico directo, la conservación de la capacidad productiva (y la calidad producida) de los ecosistemas ha constituido el centro de la gestión agronómica en el marco de una población creciente (y un coste relativamente bajo de los recursos empleados) (Hooper y Dukes, 2004). La diversidad, en cualquiera de sus estratos o componentes, tiene un demostrado papel en la utilización y eficiencia en el uso de recursos, dando como consecuencia sistemas más productivos (Hooper et al. 2004). A nivel de ecosistema, los organismos del suelo y las comunidades de plantas están íntimamente ligados. La biota del suelo influye sobre las plantas a) directamente mediante la acción de los organismos asociados a la raíz que afectan selectivamente a las especies vegetales, influyendo así sobre la productividad y estructura de la vegetación, y b) indirectamente mediante el reciclaje de la materia orgánica y el aumento en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.



Hay teorías ecológicas actuales (Chapin et al. 1997, Hooper et al. 2005) cuyos modelos predicen de qué manera los efectos de los cambios en especies y tipos funcionales se transmiten a lo largo de las distintas escalas espaciales en los sistemas ecológicos, desde las especies al paisaje, afectando a los bienes y servicios que los ecosistemas proporcionan. Cambios en el uso del suelo constituyen perturbaciones ante las cuales no todas las especies presentes reaccionarán de la misma manera (Chapin et al. 1997). Las nuevas condiciones ambientales seleccionarán un conjunto de organismos que tendrán unas características o atributos morfo-funcionales determinados (p. e., profundidad de raíces, composición química foliar), adecuados a la supervivencia bajo dichas condiciones.

Por tanto, se necesita con urgencia aumentar la información ecológica que permita establecer un puente entre el conocimiento ecológico fundamental de los servicios del ecosistema y el diseño del mejor tipo de gestión adaptado a su conservación y uso sostenible (Kremen 2005).

La encina es la especie arbórea forestal con mayor extensión en la Península Ibérica. Con una distribución circunmediterránea, aparece desde el nivel del mar hasta los 1.200 m, incluso se encuentra a 2.000 m en Sierra Nevada, aunque su óptimo altitudinal se localiza entre los 300 a 700 m, donde se establece su máxima producción, siendo la sequía estival y el frío invernal los dos factores abióticos principales que limitan su distribución (Terradas y Savé, 1992).

Una micorriza es la simbiosis entre un hongo (mycos) y las raíces (rhizos) de una planta. Como en otras relaciones simbióticas, ambos participantes obtienen beneficios. Al inicio de la colonización el hongo forma un manto constituido de hifas fúngicas que rodean el ápice de la raíz; luego otras hifas penetran el espacio intercelular entre las células radiculares, formando lo que se conoce como la red de Hartig. Es aquí en la red de Hartig donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes, minerales y agua: el hongo absorbe agua y minerales que luego transfiere hacia la planta. Por su parte el hongo obtiene de la planta sobre todo carbohidratos que él por sí mismo es incapaz de sintetizar, mientras que ella lo puede hacer gracias a la fotosíntesis y otras reacciones internas (Harrison 2005).

Tuber melanosporum Vitt. favorece el desarrollo de la encina debido a que aumenta el poder absorbente de sus raíces, facilitando la entrada de agua y componentes minerales, aumenta su resistencia a la sequía, las bajas temperaturas y a la escasez de elementos minerales, sobre todo en las primeras etapas de su desarrollo. La presencia del hongo protege a las raíces de ciertas enfermedades provocadas por microorganismos patógenos del suelo, principalmente mediante la intervención de inhibidores químicos que actúan de modo antibiótico en relación con los principales parásitos de la raíz (Phytophthora, Phytium, Fusarium, Alternaria) (Pulido, 1994). Proporciona además cierto grado de protección frente a los metales pesados contaminantes del suelo. Todo ello redundará en un mayor crecimiento de la planta en relación con otras desprovistas del hongo, siendo especialmente importante el desarrollo del sistema radicular, lo que permite a las jóvenes plantas de reforestación enfrentarse con mayores garantías de éxito a la dura sequía del verano mediterráneo (Pulido, 1994). Otra de las propiedades de la micorrización es la defensa que puede ejercer el hongo sobre las enfermedades de la encina, importante desde el punto de vista de pérdidas, tanto económica como de biodiversidad y de paisaje.

JMS²



OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el objetivo general del presente proyecto es evaluar las posibilidades de implementación del sistema simbiótico encina-trufa negra en zonas de dehesa salmantina, con el fin, por un lado, de reforestar exitosamente áreas de suelos degradados, y por otro lado, tratar de conseguir un aprovechamiento económico de un esquema de repoblación mediante la explotación de la trufa negra, una ectomicorriza con alto valor en el mercado.

Este objetivo general se llevará a cabo mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el desarrollo de la encina con el fin de comprobar si la micorrización con trufa negra mejora el asentamiento, pervivencia y desarrollo de la encina respecto a las encinas sin micorrizar, siendo especialmente importante el desarrollo del sistema radicular, que facilitará la entrada de agua y elementos minerales.
2. Análisis del desarrollo de la ectomicorriza en suelo adhesionado: evolución y cuantificación de la biomasa fúngica, con el fin de valorar si el cultivo de esta trufa puede ser una alternativa de explotación rentable para suelos degradados o terrenos de cultivo abandonados
3. Análisis del impacto del sistema encina-trufa negra sobre el ecosistema edáfico: análisis comparativo de la microbiota edáfica en la rizosfera de los dos tipos de encina, micorrizada y sin micorrizar.

METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO

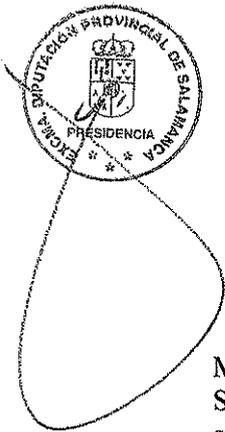
La finca experimental de Castro Enríquez se encuentra incluida en la provincia corológica Mediterránea Ibérica Occidental, subprovincia CARPETANO- LEONESA, sector SALMANTINO. Su vegetación clímax correspondería a asociaciones terminales de la serie supramediterránea salmantina silicícola de la encina (*Genisto hystericis* – *Querceto rotundifoliae sigmetum*). Esta tendencia se encuentra claramente modificada por la intervención antrópica, apreciándose la existencia de una notable degradación, desarrollándose en una zona de ecotonía donde hay presencia del quejigo (*Quercus faginea* Lam.) y el rebollo (*Quercus pyrenaica* Willd).

Dentro de ese proyecto se ha puesto en marcha una prueba piloto experimental -en una parcela de una hectárea de extensión, para la plantación de encinas micorrizadas con el ascomiceto *Tuber melanosporum* Vitt. Los ejemplares de encina son muy jóvenes, ya que es muy difícil micorrizar con trufa negra árboles de cierta edad, debido a que presentan sus raíces colonizadas por otros hongos.

Diseño experimental

La plantación ocupa una superficie de 1 Ha, de las 550 Ha totales de la finca. Las encinas se plantarán a marco cuadrado de 5 m x 5 m en marzo de 2014, para lo cual se emplearán plantas de encinas cultivadas en envase y micorrizadas artificialmente (316), y un 10% de plantas de encina no micorrizadas (32), que nos servirán de testigo o control (Figura 1).

En la parcela seleccionada se ha realizado un encalado para corregir el pH del suelo hacia la alcalinidad, con objeto de que se pueda favorecer el desarrollo de la trufa negra, debido a que las condiciones iniciales no eran óptimas para el desarrollo de la micorrización seleccionada.



[Firma manuscrita]

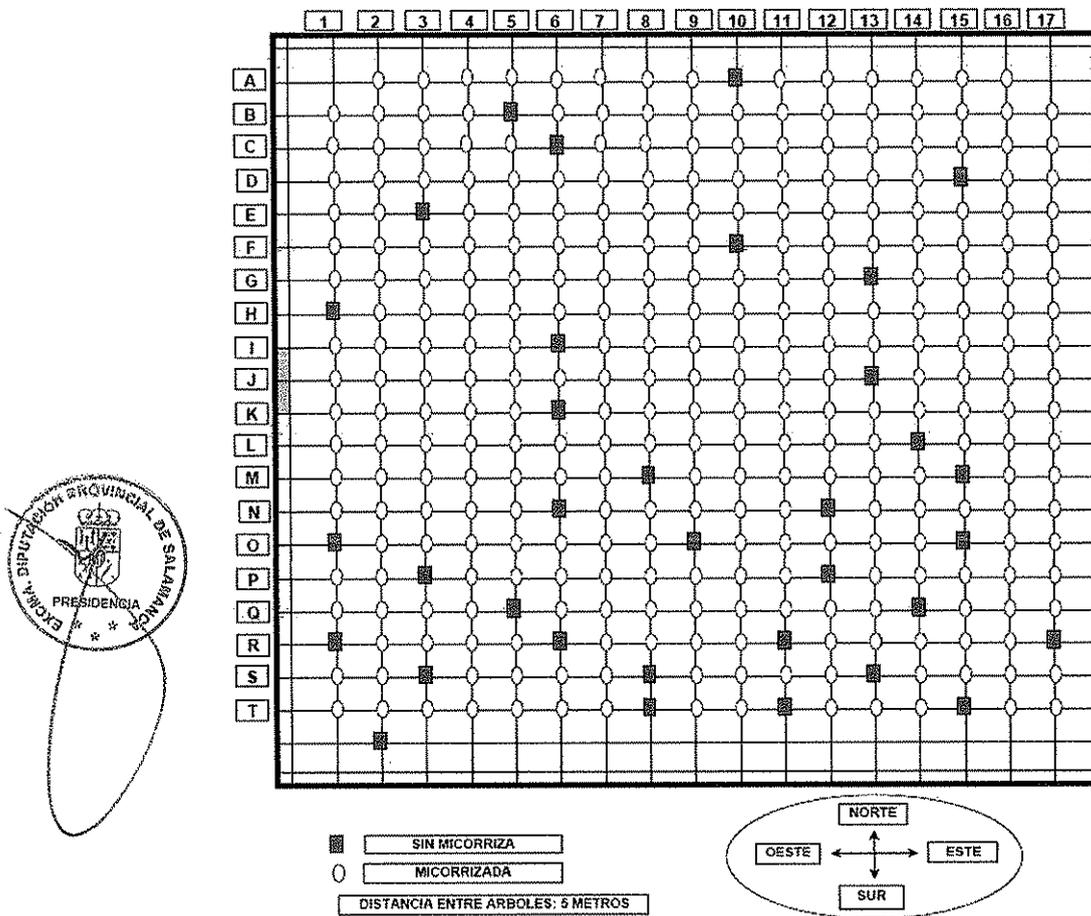


Figura 1. Distribución de la siembra de encinas

Todos los análisis químicos y biológicos se realizarán en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

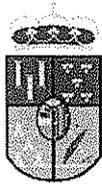
1. Muestreos de suelos y análisis de sus parámetros tanto biológicos como físico-químicos.

Para el estudio del medio edáfico se tomarán muestras para la determinación de diversas características físicas, químicas y bioquímicas. Con una azadilla se retirará la materia orgánica de la superficie del suelo y se recogerá la tierra de los primeros 10 cm del suelo y se introducirá en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio. Se tomarán 5 réplicas en cada ciclo biológico, constituidas por tres muestras elementales que se introducirán en la misma bolsa.

El pH se medirá en pasta saturada frente a agua destilada y KCl mediante un pH-metro.

Asimismo se estimará la **textura** (porcentaje de arenas, limos y arcillas) del suelo, mediante análisis mecánico del suelo.

Handwritten signature



El procedimiento para la determinación del **carbono total**, **materia orgánica** y del **nitrógeno total** será similar al de las muestras vegetales, pero se pesarán 0.1 para el carbono y materia orgánica y 1 g de suelo seco para el nitrógeno.

Para la determinación de **fósforo asimilable** se empleará el método de Bray-Kurtz (1945) de lectura fotométrica. Después de 6 y antes de 15 minutos se realizarán las lecturas a 600 nm en un espectrofotómetro CARY 50 PROBE.

La determinación de **calcio**, **magnesio** y **potasio** se realizarán de forma similar a la empleada para las muestras vegetales. El calcio, potasio y magnesio extraídos se medirán en un espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN 220 Fast Sequential.

2. Valoración y seguimiento del pH en el suelo para favorecer el cultivo óptimo de la trufa negra.

Cada ciclo biológico se estimará el pH del suelo para valorar si hay que realizar nuevas **enmiendas** que favorezcan el desarrollo de la trufa a pH superior a 7.

3. Análisis de la influencia de la micorrización con trufa negra:

- Supervivencia y crecimiento.

Con el fin de establecer diferencias en la biomasa aérea entre los dos tipos de encina: micorrizada y no micorrizada se medirán anualmente el diámetro y la altura de todos los árboles de la parcela. A fin de obtener la estimación más exacta de la biomasa se arrancarán 5 encinas micorrizadas y 2 no micorrizadas, de las que se separarán y pesarán hojas, ramas, tronco y raíces. Se tomarán submuestras de estas secciones y se llevarán al laboratorio donde se secarán en una estufa de desecación MEMMERT a 80 °C para determinar su humedad y para su posterior análisis.

Para estimar la variación estacional de los nutrientes contenidos en hojas, se seleccionarán 9 y 3 encinas micorrizadas y no micorrizadas respectivamente. Se realizarán tres muestreos anuales (junio, septiembre y diciembre) a distintas alturas del árbol (baja, media y alta) durante cinco años (2014-2018). Las muestras se llevarán al laboratorio donde se secarán en una estufa de desecación a 80 °C para determinar su humedad y se molerán para su posterior análisis.

Además se evaluarán distintos índices foliares, los cuales reflejarán el estado nutricional de la planta seleccionada.

La eficiencia en la reabsorción (NRE) desde las hojas a las partes perennes del árbol (%) se define como (Piatek y Allen, 2000; Hagen-Thorn et al, 2006):

$$NRE = ((\text{concentración de nutrientes en las hojas verdes} - \text{concentración de nutrientes en las hojas senescentes}) / \text{concentración de nutrientes en las hojas verdes}) \times 100$$

La proficiencia o habilidad en la reabsorción: nivel mínimo a partir del cual la planta puede reducir la concentración de un elemento antes de su senescencia (Killingber, 1996; Killingber y Whitford, 2001, Coté et al. 2002)

 5



- Nutrición mineral: asimilación de N, P, K y otros bioelementos.

Los elementos a determinar en las muestras vegetales serán: carbono total, nitrógeno total, fósforo, calcio, magnesio, y potasio.

El **carbono orgánico** se determinará por vía seca mediante un CARMHOGRAPH 12 WÖSTHOFF. En este analizador se produce la combustión de 0.03 g de muestra molida y seca en una atmósfera de oxígeno a 950-1000°C.

La determinación del contenido de **nitrógeno total** se llevará a cabo con un Autoanalizador 3 BRAN LUEBBE. La mineralización del nitrógeno orgánico se efectuará por digestión húmeda.

Con el fin de realizar el mayor número posible de determinaciones con un mínimo de muestra, logrando con ello una mayor economía de tiempo y una mayor exactitud (sobre todo en estudios comparativos), se realizará la determinación directa de P, Ca, Mg y K en una sola mineralización de la misma, por calcinación.

El **fósforo** se determinará por colorimetría mediante el método del amarillo de vanadato-molibdato. Al final del proceso las lecturas se realizarán a 400 nm en un espectrofotómetro CARY 50 PROBE.

El **calcio** y **magnesio** se determinarán por espectroscopia de absorción atómica, mientras que el **potasio** se determinará en fotometría de llama. Todos estos elementos se medirán en un espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN 220 Fast Sequential.

- Desarrollo radicular

El procedimiento a seguir para la obtención de la longitud de raíces constará de las siguientes etapas: a) muestreos; b) lavado y decantación de la muestra; c) teñido y distribución de las raíces y d) conteo.

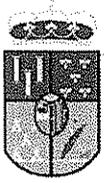
Las muestras de suelo para la obtención de raíces se extraerán utilizando un tubo de acero de 6,35 cm de diámetro. Cada muestra se colocará en agua por un período no menor de cuatro horas y se agitará posteriormente con una varilla de vidrio para lograr la ruptura de los agregados y obtener una adecuada suspensión del suelo. Posteriormente el material será sumergido durante un minuto en solución acuosa de Rojo Congo al 1%, y al final se lavará con suficiente agua para eliminar excedentes del colorante.

4. Detección mediante técnicas de Biología Molecular (PCR cuantitativa en tiempo real) de la trufa negra en suelo: Distribución y profundidad.

Durante los últimos 25 años se ha producido un avance espectacular en el estudio de la biodiversidad y ecología de las comunidades microbianas gracias al desarrollo de nuevas técnicas de análisis de la comunidad microbiana en su conjunto, por un lado las técnicas moleculares de análisis no dependientes de aislamiento y cultivo de los microorganismos, consistentes en analizar el DNA extraído directamente del suelo (metagenómica), el análisis de transcritos de RNA (transcriptómica), el análisis de proteínas (proteómica) o metabolitos (metabolómica) ha permitido descubrir que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que se pensaba, y avanzar en los conocimientos sobre la relación de la biodiversidad y la funcionalidad ecológica de los



6



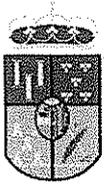
microorganismos en su medioambiente, y profundizar en los mecanismos de establecimiento y pervivencia de las simbiosis planta-microorganismo. Gracias a esto, hoy es posible monitorizar la simbiosis planta-micorriza mediante la extracción directa de ácidos nucleicos y su amplificación por PCR (Guidot et al., 2002, 2003; Ranjard et al., 2003).

La detección y análisis de la presencia en el suelo de micelio extrarradicar de *Tuber melanosporum* se llevará a cabo mediante PCR convencional y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT PCR) que es una técnica metagenómica muy útil y especie-específica que permite cuantificar la biomasa microbiana del hongo ectomicorrízico. Para ello se utilizarán primers específicos que tienen como diana los espacios intergénicos ribosomales (ITS) y sondas Taqman que permitirán analizar la pervivencia, distribución y cuantificación de su biomasa en simbiosis con la encina.

5. Evaluación del efecto de la micorrización sobre la estructura de la microbiota edáfica mediante análisis de ácidos grasos (PLFAs)

La determinación de la estructura de la microbiota edáfica (abundancia relativa de los grupos microbianos) se realizará mediante el análisis de los ácidos grasos de fosfolípidos (PLFAs, phospholipid fatty acids). El análisis de PLFAs es una técnica bioquímica que explota las diferencias existentes entre los grupos de organismos en la composición lipídica de la membrana celular. En conjunto, el análisis PLFAs aporta tres tipos de información: (i) el patrón de PLFAs es una "huella dactilar" bioquímica de la comunidad microbiana; (ii) da una estimación de la biomasa total en la muestra (la suma de las concentraciones de todos los ácidos grasos detectados); y, al existir ácidos grasos que son específicos de grupo, (iii) permite cuantificar la abundancia relativa de diferentes grupos microbianos (abundancia relativa de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, actinobacterias, hongos endomicorrízicos y hongos saprofiticos).

El análisis del perfil de PLFAs comenzará a partir de una de las alícuotas de los suelos muestreados. Se realizará en ellos una extracción con una solución tampón cloroformo-metanol-citrato (1:2:0,8). Seguido a esa extracción, se procede a la separación de los fosfolípidos mediante columnas de extracción de fase sólida (0.5 g Si; Supelco Co.) utilizando solventes de polaridad creciente. Una vez separados, los fosfolípidos son transesterificados y metilados dando metilésteres de ácidos grasos (FAMEs, fatty acid methyl esters). Los FAMEs resultantes del proceso anterior se separarán por cromatografía de gases en un cromatógrafo 7890A GC system (Agilent Technologies) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna HP-ULTRA 2 (Agilent Technologies). La identificación de los distintos FAMEs en los cromatogramas se realizará con el programa informático MIDI Sherlock System, y su cuantificación por comparación con el área del pico de un estándar interno (FAME 19:0) de concentración conocida que será incluido en cada muestra. La cantidad de FAMEs específicos de un determinado grupo (p. ej.: de hongos micorrízicos, de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, de actinobacterias, etc) se convertirán en porcentajes sobre el total de los presentes en la muestra.



BIBLIOGRAFÍA

- Bray, R.H.; Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59, 39-45.
- Chapin, F.S.III, Walker B.H., Hobbs R.J., Hooper D.U., Lawton J.H., Sala O.E., & Tilman D. 1997. Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science*, 277, 500-504.
- Cotê, B., Fyles, W., Djalilvand, H. 2002. Increasing N and P resorption efficiency and proficiency in northern deciduous hardwoods with decreasing foliar N and P concentrations. *Annals of Forest Science*, 59, 275-281.
- Guidot A, Debaud J, Effosse A, Marmeisse R. 2003. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytology*, 161,539-547.
- Guidot, A., J.C. Debaud, R. Marmeisse. 2002. Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 42,477-486.
- Hagen-Thorn, A., Varnagirytel, I., Nihlgård, B., Armolaitis, K. 2006. Autumn nutrient resorption and losses in four deciduous forest tree species. *Forest Ecology and Management*, 228, 33-39.
- Harrison, M.J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59, 19-42.
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A. 2005. Effects of Biodiversity on Ecosystem Functioning: A Consensus of Current Knowledge. *Ecological Monographs*, 75 (1), 3-35.
- Hooper, D. U., Dukes, J. S.. 2004. Overyielding among plant functional groups in a long-term experiment. *Ecology Letters*, 7, 95-105.
- Killingbeck, K.T. 1996. Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology*, 77, 1716-1727.
- Killingbeck, K.T, Whitford, W.G. 2001. Nutrient resorption in shrubs growing by design, and by default in Chihuahuan Desert arroyos. *Oecologia*, 128, 351-359.
- Kremen, C. 2005. Managing ecosystem services: what do we need to know about their ecology? *Ecology Letters*, 8, 468-479.
- Piatek, K.B.; Alen, H.L. 2000. Site preparation effects on foliar N and P use, retranslocation, and transfer to litter in 15-years old *Pinus taeda*. *Forest Ecology and Management*, 129, 143-152.
- Pulido Pastor, A. 1994. Micorrización sencilla para viveros elementales. *Revista Quercus*, cuaderno 105. Madrid, págs. 34-36.
- Ranjard, L., D.P. Lejon, C. Mougél, L. Schehrer, D. Merdinoglu, R. Chaussod. 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNMA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5, 1111-1120
- Terradas, J., Savè, R. 1992. The influence of summer and winter stress and water relations on the distribution of *Quercus ilex* L. *Vegetatio* 99 -100, 137-145.





GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Temática del grupo:

La investigación del grupo es multidisciplinar, consecuente con la tendencia actual de las prioridades en las convocatorias de proyectos I+D europeos y del Plan Nacional. A tal fin se llevan a cabo estudios de la microbiota rizosférica, incluyendo *Frankia*, rhizobia y otros microorganismos beneficiosos PGPR. En particular, se estudian los vínculos tróficos entre la microbiota y la cubierta vegetal, así como sus efectos sobre la conservación y/o aumento de la biodiversidad vegetal y microbiana en un contexto de desarrollo sostenible agroforestal. El grupo cuenta con la experiencia obtenida en la realización de varios proyectos, como son el CLUE, TLinks, MANCHEST de la UE. Concorre en la actualidad a otras convocatorias nacionales con los proyectos del Plan Nacional I+D+I y de Castilla y León.

Líneas de investigación

a) Desarrollo sostenible de sistemas agroforestales:

El objetivo principal de la línea "Desarrollo sostenible de sistemas agroforestales es un mejor conocimiento de la diversidad microbiana y de los procesos implicados en los ecosistemas agrícolas y forestales.

La investigación en esta línea estudia las comunidades bacterianas del suelo, especialmente las rizobacterias beneficiosas para las plantas (PGPR) y sus interacciones con estas últimas, enfocando el estudio en su biodiversidad, taxonomía, y papel ecológico, enfatizando en:

1. El papel ecológico de las bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos en la promoción del crecimiento de las plantas, con atención a la dinámica y el manejo de las comunidades rizosféricas en los agrosistemas.
2. El diseño de inoculantes multicépa como biofertilizantes para la agricultura.
3. La biodiversidad y taxonomía de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), especialmente *Frankia*, rhizobia, bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB).
4. Las bases moleculares de las simbiosis fijadoras de nitrógeno, y en particular la composición, distribución y filogenia de los genes implicados en la nodulación y la fijación de nitrógeno.

b) Dinámica biogeoquímica en ecosistemas forestales.

c) Biodiversidad vegetal.

Personal

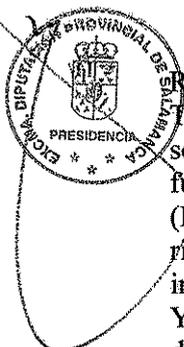
El Dr. Ignacio Santa Regina lleva trabajando durante más de treinta años en aquellos procesos de Ecología Vegetal que involucran un desarrollo sostenible de nuestros bosques autóctonos, para lo cual ha desarrollado un estudio pormenorizado de la biomasa área vegetal, como de su mineralomasa intrínseca. Asociado a ello lleva implícito la evolución estacional de dicha mineralomasa, que va asociada o bien al proceso de retranslocación en el momento de la senescencia de las hojas, como de la caída y su retorno al suelo por medio de la hojarasca; ello





comporta el estudio del retorno potencial de bioelementos al suelo, o bien el retorno efectivo por medio del proceso de descomposición, bien natural o bien artificialmente mediante el experimento de "litter bags". Asimismo, ha conformado un grupo de trabajo en torno al estudio de la biodiversidad vegetal, con el objetivo de acelerar las etapas de la sucesión secundaria en campos de cultivo abandonados, para alcanzar cuanto antes la etapa clímax, o bosque, introduciendo procesos de estudio como la colonización, invasión, competencia y resiliencia.

El **Dr. José Mariano Igual Arroyo** realizó su Tesis Doctoral en el IRNASA (1996), titulada "Efectos del aluminio y del estrés salino sobre el crecimiento y fijación simbiótica del nitrógeno en especies de la familia *Casuarinaceae*", defendida en 1996 y dirigida por los Drs. Rodríguez Barrueco y E. Cervantes. Entre los años 1996 y 1998 realizó su formación postdoctoral, mediante una beca del MEC, en el laboratorio del Prof. J. O. Dawson (Univ. de Illinois, USA). A su regreso de EE.UU se reincorporó al IRNASA, y en el año 2006 consiguió plaza de Científico Titular de OPI. Su labor investigadora en esta última etapa se ha centrado en el estudio de las interacciones beneficiosas entre las plantas y microorganismos y en la ecología microbiana de los suelos.



El **Dr. Álvaro Peix Geldart**, es Científico Titular del CSIC, se incorporó al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) en 1996, donde llevó a cabo su Tesis Doctoral sobre el estudio de poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato y su efecto sobre leguminosas y cereales de interés agronómico, que fue defendida en 1999. Posteriormente fue becario postdoctoral en el Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA) en Dijon (Francia), donde trabajó con los doctores G. Catroux y G. Laguerre sobre rizobia y otras rizobacterias asociadas a la rizosfera de guisante. En 2006 realizó asimismo una estancia como investigador visitante gracias a una beca de The Royal Society y el CSIC en la Universidad de York con el Prof. Peter Young. Sus investigaciones se han centrado en la ecología microbiana y diversidad de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), en especial biodiversidad de rizobia y de bacterias solubilizadoras de fosfato, y ha participado en el desarrollo y puesta a punto de técnicas moleculares aplicadas al estudio de la diversidad microbiana, entre otras análisis RISA, perfiles de LMW RNA, HSGME, etc. En la actualidad participa en distintos proyectos de investigación sobre éstos temas, seleccionando cepas PGPR implicadas en los ciclos del nitrógeno y el fósforo y su efecto sobre la producción de cultivos como fresa, tomate, pimiento, patata etc, y recientemente ha sido investigador principal de varios proyectos centrados en el aislamiento y ensayo de cepas de rizobia tolerantes a factores de estrés en el suelo como la acidez y salinidad y su efecto en leguminosas como judía, alfalfa o haba. Actualmente es también investigador principal en un proyecto enfocado al desarrollo de inoculantes microbianos como biofertilizantes específicos para patata y en otro destinado a mejorar la eficiencia de los fertilizantes orgánicos mediante el uso de microorganismos.

Instalaciones, instrumentos y técnicas disponibles para la realización del proyecto:

Nuestro equipo de investigación cuenta con las instalaciones del IRNASA-CSIC de Salamanca para llevar a cabo todos los análisis propuestos.

En el Laboratorio de Biología Molecular se pueden realizar los siguientes análisis:

- Equipo de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) para cuantificación de ácidos nucleicos (niveles de transcripción, etc), detección de mutaciones y estudios de estabilidad proteica.



- Soporte bioestadístico y bioinformático, con el aparataje necesario para la adquisición de imágenes de geles y blots, para el análisis de resultados en dichos soportes.
- Para la realización de estas técnicas el Laboratorio de Biología Molecular dispone de los siguientes equipos:
 - Planta de fermentación a media escala, compuesta de:
 - Fermentador Applikon BioBench de 30 litros.
 - Centrifuga semicontinua CEPA LE (30 litros/hora).
 - Homogeneizador Emulsiflex-C3 (prensa francesa, 3 litros/hora).
 - Equipo de PCR cuantitativa en tiempo real modelo 7900HT de Applied Biosystems.

Además, se incluyen: invernaderos, fitotrones, servicio de secuenciación de DNA, Real Time PCR, cromatógrafo de gases AGILENT mod. 7890A, microscopía confocal, microscopía de barrido y TEM, autoclaves, equipos de análisis de geles, campanas para microbiología, centrifugas, espectrofotómetros, equipos de purificación de agua, secadores de geles y DNA a vacío, etc.

Por lo que respecta a las técnicas biogeoquímicas (análisis de suelos y planta) se incluyen (servicio de análisis e instrumentación):

Espectrofotómetro UV-Visible Varian (modelo Cary 50 Probe).
Espectrofotómetro UV-Visible Varian (modelo Cary 100 Conc).
Autoanalizador de flujo segmentado Bran+Luebbe (modelo AA3) equipado con colorímetro digital.
Espectrómetro de Absorción Atómica (EAA) Varian (modelo SpectrAA 220/FS) equipado con generador de hidruros VGA 76 y horno de grafito-GTA 110.
Espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Varian (modelo 720-ES).
Analizador NIR de reflexión (NIRR) para grano entero Perten Instruments (modelo Inframatic 9200).

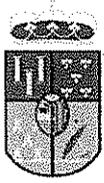
Publicaciones más relevantes del grupo investigador durante los últimos dos años.

- Silva, L.R.; Azevedo, J.; Pereira, M.J.; Carro, L.; Velazquez, E.; Peix, A.; Valentão, P.; Andrade, P.B. 2014. Inoculation of the nonlegume *Capsicum annuum* (L.) with *Rhizobium* strains. 1. effect on bioactive compounds, antioxidant activity, and fruit ripeness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 557-564.
- Sánchez-Juanes, F.; Ferreira, L.; Alonso de la Vega, P.; Valverde, A.; Barrios, M.L.; Rivas, R.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; González-Buitrago, J.M.; Trujillo, M.E.; Velázquez, E. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: Application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 36: 565-571.
- Carro, L.; Flores-Félix, J.D.; Cerda-Castillo, E.; Ramírez-Bahena, M.H.; Igual, J.M.; Tejedor, C.; Velázquez, E.; Peix, A. 2013. *Paenibacillus endophyticus* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 4433-4438.
- Santa-Regina, I.; Santa-Regina, M.C. 2013. Restoration of biodiversity and ecosystem. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*, 6(1): 69-86.
- Boulmane, M.; Santa-Regina, M.C.; Santa-Regina, I. 2013. Biomass and organic carbon stocks in the soils: Carbon storage in the oak evergreen forest ecosystems of the Middle and High



- Moroccan Atlas areas*. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing. 56 p. ISBN 978-3-659-37150-9.
- Santa-Regina, M.C.; Santa-Regina, I.; Álvarez-Díaz, J.E. 2013. *Cambio de uso de la tierra: aumento de la biodiversidad y desarrollo del ecosistema*. Saarbrücken: Editorial Académica Española. 110 p. ISBN 978-3-659-06886-7.
- Santa-Regina, M.C.; Santa-Regina, I. 2013. *Dynamics of organic matter and nutrient cycling release in forest*. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing. 108 p. ISBN 978-3-659-35649-0.
- Santa-Regina, I.; Gondard, H.; Santa-Regina, M.C. 2013. *Forest management and plant species diversity in chestnut stands: forest management and plant species diversity*. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing. 53 p. ISBN 978-3-659-33243-2.
- Santa-Regina, I.; Álvarez-Díaz, J.E.; Santa-Regina, M.C. 2013. *Long-term changes in semi-arid vegetation from abandonment lands: plant species diversity on exarable lands*. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing. 88 p. ISBN 978-3-659-36043-5.
- Santa-Regina, M.C.; Santa-Regina, I. 2013. *Restoration and ecosystem consequences of changing biodiversity*. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing. 58 p. ISBN 978-3-659-34647-7.
- Álvarez-Díaz, J.E.; Santa-Regina, M.C.; Santa-Regina, I. 2013. *Restauración de la diversidad vegetal en cultivos abandonados*. Saarbrücken: Editorial Académica Española. 351 p. ISBN 978-3-659-07004-4.
- Anawar, H.M.; Canha, N.; Santa-Regina, I.; Freitas, M.C. 2013. Adaptation, tolerance, and evolution of plant species in a pyrite mine in response to contamination level and properties of mine tailings: sustainable rehabilitation. *Journal of soils and sediments*, 13: 730-741.
- Boulmane, M.; Santa-Regina, I.; Khia, A.; Abbassi, H.; Halim, M. 2013. Aboveground biomass and nutrient pools in two evergreen oak stands of the Middle Moroccan Atlas Area. *Arid Land Research and Management*, 27: 188-202.
- Álvarez-Ayuso E.; Otones V.; Murciego A.; García-Sánchez A.; Santa Regina I. 2013. Mobility and phytoavailability of antimony in an area impacted by a former stibnite mine exploitation. *Science of the Total Environment*, 449: 260-268.
- El Khalloufi, F.; Oufdou, K.; Lahrouni, M.; Faghire, M.; Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Vasconcelos, V.; Oudra, B. 2013. Physiological and antioxidant responses of *Medicago sativa*-rhizobia symbiosis to cyanobacterial toxins (Microcystins) exposure. *Toxicon*, 76: 167-177.
- Toro, M.; Ramírez-Bahena, M.H.; Cuesta, M.J.; Velázquez, E.; Peix, A. 2013. *Pseudomonas guariconensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil in Guárico state, Venezuela. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 4413-4420.
- García-Balboa, C.; Baselga-Cervera, B.; García-Sánchez, A.; Igual, J.M.; Lopez-Rodas, V.; Costas, E. 2013. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*, 144-145: 116-123.
- Ramírez-Bahena, M.-H.; Chahboune, R.; Velázquez, E.; Gómez-Moriano, A.; Mora, E.; Peix, A.; Toro, M. 2013. Centrosema is a promiscuous legume nodulated by several new putative species and symbiovars of *Bradyrhizobium* in various American countries. *Systematic and Applied Microbiology*, 36: 392-400.
- Andres, J.; Arsene-Ploetze, F.; Barbe, V.; Brochier-Armanet, C.; Cleiss-Arnold, J.; Coppee, J.Y.; Dillies, M.A.; Geist, L.; Joubin, A.; Koechler, S.; Lassalle, F.; Marchal, M.; Medigue, C.; Muller, D.; Nesme, X.; Plewniak, F.; Proux, C.; Ramirez-Bahena, M.H.; Schenowitz, C.; Sismeiro, O.; Vallenet, D.; Santini, J.M.; Bertin, P.N. 2013. Life in an arsenic-containing





- gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp NT-26. *Genome Biology and Evolution*, 5: 934-953.
- Guerrouj, K.; Ruíz-Díez, B.; Chahboune, R.; Ramírez-Bahena, M.-H.; Abdelmoumen, H.; Quiñones, M.A.; El Idrissi, M.M.; Velázquez, E.; Fernández-Pascual, M.; Bedmar, E.J.; Peix, A. 2013. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic and Applied Microbiology*, 36: 218-223.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Chahboune, R.; Peix, A.; Velázquez, E. 2013. Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 1013-1016.
- Azziz, G.; Bajsa, N.; Haghjou, T.; Taulé, C.; Valverde, A.; Igual, J.M.; Arias, A. 2012. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 61: 320-326.
- Ramos, E.; Ramírez-Bahena, M.H.; Valverde, A.; Velázquez, A.; Zúñiga, D.; Velezmoro, C.; Peix, A. 2013. *Pseudomonas punonensis* sp. nov., isolated from straw. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 1834-1839.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Tejedor, C.; Martín, I.; Velázquez, E.; Peix, A. 2013. *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil in Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 1760-1765.
- Chahboune, R.; Carro, L.; Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Barrijal, S.; Velázquez, E.; Bedmar, E.J. 2012. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Systematic and applied microbiology*, 35: 302-305.
- Salazar, S.; Sánchez, L.E.; Galindo, P.; Santa-Regina, I. 2012. Long-term decomposition process of the leaf litter, carbon and nitrogen dynamics under different forest management in the Sierra de Francia, Salamanca, Spain. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2 (3B): 312-328.
- Álvarez-Ayuso, E.; Otones, V.; Murciego, A.; García-Sánchez, A.; Santa-Regina, I. 2012. Antimony, arsenic and lead distribution in soils and plants of an agricultural area impacted by former mining activities. *Science of the Total Environment*, 439: 35-43
- Anawar, M.; García Sánchez, A.; Santa Regina, I.; Mihajjevic, M.; Moyano, A.; Ahmed, G. 2012. Phytoavailability and Toxicity of Arsenic-contaminated Mine Tailings: Perspective on Public Health Issue. En: Nriagu, J.; Szefer, P.; Pacyna, J.; Markert, B.; Wünschmann, S. (eds.). *Heavy Metals in the Environment: Selected Papers from the ICHMET-15 Conference* (pp. 45-58). Voorschoten (The Netherlands): Maralte. ISBN 978-94-909-70-00-0.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Hernández, M.; Peix, A.; Velázquez, E.; León-Barrios, M. 2012. Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in *Tamadaya ravine* (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 35: 334-341.
- García-Fraile, P.; Carro, L.; Robledo, M.; Ramírez-Bahena, M.-H.; Flores-Félix, J.-D.; Fernández, M.T.; Mateos, P.F.; Rivas, R.; Igual, J.M.; Martínez-Molina, E.; Peix, A.; Velázquez, E. 2012. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One* 7 (5): e38122
- Lahroumi, M.; Oufdou, K.; Faghire, M.; Peix, A.; El Khalloufi, F.; Vasconcelos, V.; Oudra, B. 2012. Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae). *Ecotoxicology*, 21: 681-687



Faghire, M.; Mandri, B.; Oufdou, K.; Bargaz, A.; Ghoulam, C.; Ramírez-Bahena, M. H.; Velázquez, E.; Peix, A. 2012. Identification at species and symbiovar levels of strains nodulating *P. vulgaris* in saline soils of Marrakech region (Morocco) and analysis of *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 35: 156-164.

Cronograma de dedicación del equipo investigador (Figura 2)

1. Muestreos de suelos y análisis de sus parámetros tanto biológicos como físico-químicos.

Responsables los Drs: Ignacio Santa-Regina Rodríguez y Mariano Igual Arroyo durante los cinco años del periodo experimental

2. Valoración y seguimiento de las enmiendas aplicadas a los suelos para favorecer el cultivo de la trufa negra.

Responsables los Drs: Ignacio Santa-Regina Rodríguez y Álvaro Peix Geldart durante los cinco años del periodo experimental

3. Análisis de la influencia de la micorrización con trufa negra:

- Supervivencia y crecimiento
- Nutrición mineral: asimilación de N, P, K y otros bioelementos

Responsables los Drs: Ignacio Santa-Regina Rodríguez, Mariano Igual Arroyo y Álvaro Peix Geldart durante los cinco años del periodo experimental

4. Detección mediante técnicas de Biología Molecular (PCR cuantitativa en tiempo real) de la trufa negra en suelo: Distribución y profundidad.

Responsables los Drs: Álvaro Peix Geldart, Mariano Igual Arroyo e Ignacio Santa-Regina Rodríguez durante los cinco años del periodo experimental.

5. Evaluación del efecto de la micorrización sobre la estructura de la microbiota edáfica mediante análisis de ácidos grasos (PLFAs)

Responsables los Drs: Mariano Igual Arroyo y Álvaro Peix Geldart durante los cinco años del periodo experimental.



Figura 2. Cronograma previsto

Tareas	1 ^{er} año		2 ^o año		3 ^{er} año		4 ^o año		5 ^o año	
1. Bibliografía										
2. Diseño experimental										
3. Muestreos de suelos y análisis de sus parámetros tanto biológicos como físico-químicos.										
4. Valoración y seguimiento del pH del suelo para favorecer el cultivo de la trufa negra										
5. Análisis de la influencia de la micorrización con trufa negra										
6. Detección mediante técnicas de Biología Molecular (PCR cuantitativa en tiempo real) de la trufa negra en suelo: Distribución y profundidad										
7. Evaluación del efecto de la micorrización sobre la estructura de la microbiota edáfica mediante análisis de ácidos grasos (PLFAs)										
8. Procesamiento de datos										
9. Discusión										
10. Memoria final										

PRESUPUESTO DE GASTOS DEL PROYECTO PARA LOS CINCO AÑOS DE EXPERIMENTACIÓN (en euros)

Imputación del 10% de los costes del personal asignado al proyecto (incluida la Seguridad Social) correspondiente a los 3 Doctores responsables y personal de laboratorio (1 Titulado Superior y 1 Técnico Superior de Actividades Técnicas y Profesionales)

126.734,26

Análisis de parámetros biogeoquímicos y de Biología Molecular

18.500,00

MATERIAL FUNGIBLE:

Reactivos y materiales para la extracción de PLFAs (columnas de sílica, n-hexano, cloroformo, metanol, tolueno, etc)

5.500,00

Reactivos PCR y electroforesis

10.500,00

Material fungible para cromatografía de gases (viales, septums, liners, columna cromatográfica, etc)

6.000,00

Kits comerciales para extracción de Ácidos Nucleicos

5.800,00

Material de plástico

3.300,00

Material de vidrio

2.800,00

Material de oficina e informático

2.900,00

*[Handwritten signature]*¹⁵



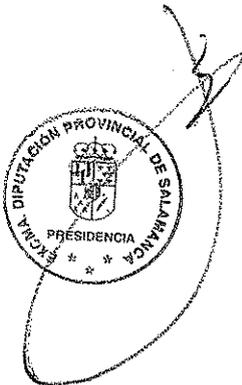
VIAJES Y DIETAS:

Recogida de muestras 2.300,00

OTROS GASTOS GENERALES:

Mantenimiento de aparatos, preparación de informes,
difusión de resultados, etc. 2.400,00

TOTAL 186.734,26



JM 16