

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Enfermedades de la madera de la vid y su relación con la microbiota edáfica asociada a viñedos ecológicos singulares**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Rafael Alejandro Alonso Conde**

DIRECTORA

**Domingo Marquina Díaz**  
**María de los Ángeles Gómez Flechoso**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID Y SU RELACIÓN CON LA  
MICROBIOTA EDÁFICA ASOCIADA A VIÑEDOS ECOLÓGICOS SINGULARES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

RAFAEL ALEJANDRO ALONSO CONDE

DIRECTOR

DOMINGO MARQUINA DÍAZ  
MARÍA DE LOS ÁNGELES GÓMEZ FLECHOSO

# Enfermedades de la madera de la vid y su relación con la microbiota edáfica asociada a viñedos ecológicos singulares



**TESIS DOCTORAL**

**RAFAEL ALEJANDRO ALONSO CONDE**

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biología. Dpto. Genética, Fisiología y Microbiología



Directores de la Tesis Doctoral:  
Dr. Domingo Marquina Díaz  
Dra. María de los Ángeles Gómez Flechoso

Madrid 2021





ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID Y  
SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA EDÁFICA  
ASOCIADA A VIÑEDOS ECOLÓGICOS  
SINGULARES

RAFAEL ALEJANDRO ALONSO CONDE

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, FISIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

---



Memoria para optar al grado de Doctor

Madrid, 2021

Directores:

Domingo Marquina Díaz

María de los Ángeles Gómez Flechoso





*“Tell me and I forget,  
teach me and I may remember,  
involve me and I learn.”*



# Agradecimientos

Son muchas las personas que en el transcurso de esta tesis doctoral me han apoyado diariamente con dulzura y me han transmitido todo el cariño y la energía necesaria para la realización de este trabajo de investigación. Os agradezco con toda mi alma la cercanía con la que me habéis aconsejado con vuestras amables y tranquilizadoras palabras durante estos años. Estéis ahora o no estéis ya: siempre os llevo conmigo.

En primer lugar, les quiero agradecer al Dr. Domingo Marquina Díaz y a la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Gómez Flechoso, director y directora de la presente tesis doctoral, la confianza que han depositado en mi desde el primer día, la ayuda incondicional, el soporte y los conocimientos que me han transferido con su inestimable paciencia para que este trabajo llegara a buen término. También me gustaría agradecer al Dr. Antonio Santos la ayuda en mis primeros pasos por el laboratorio, la orientación en la planificación de experimentos y la discusión crítica que me ha permitido crecer como científico.

Muy especialmente agradezco a la Dra. Eva Navascués, por la confianza depositada en mi y su apoyo constante.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Ángel Luis Villar por sus acertadas recomendaciones y buenos consejos en el momento preciso. Siempre me ha brindado su confianza y apoyo con entusiasmo y optimismo. Tus palabras, llenas de saber, me han guiado durante esta etapa de mi vida.

Un agradecimiento muy especial a la Dr. Silvia Díaz por despertar mi mente crítica con sus conocimientos sobre nutrición bacteriana, más allá del papel y del texto. Esa curiosidad transmitida fue el origen de mi trabajo.

Especial agradecimiento a la Dra. Luisa Martín por ayudarme, por ceder los equipos y el material necesario para efectuar ensayos enzimáticos en suelo, por su capacidad para transmitirme paz. A la Dra. Aránzazu Gómez por sus acertados consejos y apoyo durante mi trabajo.

Gracias a la Dra. Pilar López por enseñarme a programar con tanta amabilidad y dedicación.

Quiero agradecer al Dr. Cristóbal Viedma la visión pragmática en resolución de problemas que me transmitido con su conocimiento crítico. Gracias a Belén Soutullo por explicarme los fundamentos de la difracción de rayos X en detalle, por su amabilidad y sus palabras de aliento.

Agradezco también a todos los miembros de la Unidad Docente de Microbiología por acogerme en un entorno de trabajo agradable y por su interés en la evolución de este trabajo. Al personal de los CAIs por su amable trato e implicación en los ensayos.

Gracias al Dr. Ignacio Belda por su ayuda incondicional, siempre estás cuando me encuentro apurado, y por hacer que el espacio de trabajo fuera confortable. Javier R., Javier V., Pedro, Miguel gracias por vuestro apoyo y por escucharme siempre que lo necesitaba. Sin vosotros, sin vuestros consejos, sin vuestro ritmo, no hubiera sido lo mismo.

Gracias a la Dra. Carmen Lobo y a la Dra. Pilar García, del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), por ofrecer amablemente sus equipos para realización de análisis moleculares y respiratorios del suelo.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia su comprensión, su cariño, su apoyo constante y diario durante estos años de mi vida. Habéis conseguido que mis alegrías se maximizaran y que el agobio desapareciera. Esta tesis va dedicada a vosotras y vosotros: A mi familia.

Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos ITISOST (financiado por el Centro para el Desarrollo Técnico Industrial (CDTI), IDI-20140448) y GLOBALVITI (financiado por el Centro para el Desarrollo Técnico Industrial (CDTI), en el marco del Programa Estratégico de Consorcios de Investigación Empresarial Nacional (CIEN), IDI-20160746), los cuales han permitido mi formación académica mediante la contratación laboral en calidad de Personal de Apoyo a la Investigación (PAI).





# Índice general

<b>Acrónimos y Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1. El suelo</b>	<b>13</b>
1.1. Componentes abióticos en el suelo . . . . .	14
1.1.1. Capacidad de retención de agua del suelo . . . . .	15
1.1.2. Variaciones de pH en el suelo . . . . .	15
1.1.3. Composición mineralógica del suelo . . . . .	16
1.2. Componentes bióticos en el suelo . . . . .	17
1.2.1. Respiración de los microorganismos del suelo . . . . .	18
1.3. Indicadores bioquímicos de la fertilidad del suelo . . . . .	19
1.3.1. Actividad $\beta$ -galactosidasa . . . . .	19
1.3.2. Actividad reductasa o deshidrogenasa . . . . .	19
1.3.3. Actividad fosfatasa . . . . .	20
1.3.4. Actividad proteolítica . . . . .	20
1.3.5. Diversidad microbiana en el suelo . . . . .	21
<b>2. Sistemas de producción agraria y enfermedades asociadas</b>	<b>23</b>
2.1. Sistemas monocultivo . . . . .	23
2.2. Producción vegetal destinada a la explotación agraria . . . . .	25
2.3. Enfermedades de la madera de la vid . . . . .	26
<b>3. El suelo como reservorio de microorganismos causantes de patologías vegetales</b>	<b>29</b>

<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>4. Análisis de Suelo de las parcelas vitícolas</b>	<b>37</b>
4.1. Toma de muestras de suelo y transporte . . . . .	37
4.2. Tratamiento y conservación de las muestras de suelo . . . . .	39
4.3. Parámetros físico-químicos del suelo . . . . .	40
4.3.1. Determinación de la Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente . . . . .	40
4.3.2. Determinación de parámetros electroquímicos del suelo: medidas de pH en H <sub>2</sub> O, KCl y CaCl <sub>2</sub> . . . . .	42
4.3.3. Caracterización mineralógica del suelo. Difracción de rayos X. . . . .	42
4.4. Estimación de los parámetros microbiológicos del suelo . . . . .	46
4.4.1. Recuento de microorganismos viables del suelo . . . . .	46
4.4.2. Respiración Inducida por Sustrato . . . . .	50
4.5. Perfiles bioquímicos . . . . .	52
4.5.1. Actividad Fosfatasa alcalina [EC 3.1.4.1] . . . . .	52
4.5.2. Actividad $\beta$ -galactosidasa [EC 3.2.1.22] . . . . .	53
4.5.3. Actividad deshidrogenasa [EC 1.1.x.y] . . . . .	54
4.5.4. Actividad proteasa [EC 3.4.21.122] . . . . .	54
4.6. Caracterización molecular de poblaciones microbianas del suelo . . . . .	55
4.6.1. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante . . . . .	55
4.6.2. Análisis meta-taxonómico de las muestras de suelo . . . . .	58
4.7. Análisis estadístico y extracción de datos . . . . .	58
4.8. Programa de análisis DGGE . . . . .	59
<b>5. Análisis microbiológico de la Madera de la Vid</b>	<b>61</b>
5.1. Recogida y transporte de muestras de madera en campo . . . . .	61
5.2. Obtención de muestras de vides jóvenes procedentes de vivero . . . . .	62
5.3. Conservación de las muestras de Madera . . . . .	62
5.4. Identificación de microorganismos patógenos en madera de la Vid . . . . .	62
5.4.1. Extracción y crecimiento de microorganismos fitopatógenos . . . . .	63
5.4.2. Secuenciación del ADN de las colonias fúngicas seleccionadas . . . . .	63
5.5. Identificación rápida de hongos fitopatógenos . . . . .	64
5.5.1. Microorganismos . . . . .	64
5.5.2. Extracción de ADN total . . . . .	65

5.5.3.	Identificación de cepas de <i>Cadophora luteo-olivacea</i> mediante técnicas moleculares . . . . .	65
5.5.4.	Visualización de los amplicones obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa . . . . .	66
5.6.	Análisis meta-taxonómico de las muestras de madera contaminadas . . . . .	66
5.7.	Análisis estadístico y bases de datos . . . . .	66
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Caracterización mineralógica, física y química del suelo</b>	<b>69</b>
6.1.	Resultados . . . . .	69
6.1.1.	Estimación mineralógica del suelo. Difracción de Rayos X	69
6.1.2.	Caracterización geomorfológica de las muestras analizadas	72
6.1.3.	Capacidad de retención hídrica . . . . .	78
6.1.4.	Propiedades electroquímicas del suelo. Conductividad y pH. . . . .	83
6.2.	Discusión . . . . .	85
<b>7.</b>	<b>Indicadores microbiológicos y bioquímicos de la calidad y fertilidad de suelos agrícolas</b>	<b>89</b>
7.1.	Resultados . . . . .	89
7.1.1.	Recuento de la microbiota viable general . . . . .	89
7.1.2.	Recuento de microorganismos viables de interés agrícola	93
7.1.3.	Capacidad funcional del suelo . . . . .	101
7.2.	Discusión . . . . .	108
<b>8.</b>	<b>Diversidad microbiana no-cultivable en suelos vitícolas y madera de vid</b>	<b>111</b>
8.1.	Resultados . . . . .	111
8.1.1.	Estudio de la diversidad de las poblaciones bacterianas mediante DGGE . . . . .	111
8.1.2.	Estudio meta-taxonómico de las muestras de suelo y de la madera de la vid. Secuenciación masiva de la región V3 (16S) bacteriana e ITS (26S) en hongos filamentosos.	115
8.2.	Discusión . . . . .	118
<b>9.</b>	<b>Identificación de hongos fitopatógenos en madera de vid</b>	<b>121</b>
9.1.	Resultados . . . . .	121
9.1.1.	Identificación de hongos fitopatógenos viables cultivables en plantones de vid . . . . .	121

## ÍNDICE GENERAL

---

9.1.2. Detección de hongos fitopatógenos mediante técnicas in- dependientes de cultivo . . . . .	123
9.2. Discusión . . . . .	125
<b>V. DISCUSIÓN FINAL</b>	<b>127</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>Futuras líneas de investigación</b>	<b>139</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>151</b>
<b>Anexos</b>	<b>153</b>
A. Difracción de rayos X: Difractogramas . . . . .	155
B. Código fuente en Matlab <sup>®</sup> del programa de análisis DGGE . . . . .	181
C. Autovectores de las variables geológicas . . . . .	201
D. Rectas de calibrado para actividades enzimáticas . . . . .	203
E. Artículos científicos publicados . . . . .	205

# Acrónimos y Abreviaturas

**AD:** Agua Disponible

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNr:** Ácido Desoxirribonucleico ribosomal

**ADDEst:** Agua Doble Destilada Estéril

**AEMET:** Agencia Estatal de Meteorología

**ANOVA:** Análisis de la Varianza (*ANalysis Of VAriance*)

**AO:** Agregado Orientado

**ARC:** Arcillosas

**ARN:** Arenosas

**ASTM:** Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (*American Society for Testing and Materials*)

**BLAST:** Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales (*Basic Local Alignment Search Tool*)

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

**CAL:** Calizas

**CBS-KNAW:** Oficina Central de Cultivos de Hongos Filamentosos - Instituto de Biodiversidad de Hongos Westerdijk (*Centraal Bureau voor Schimmelcultures - Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*)

**CC:** Capacidad de Campo

**CHL:** Cloranfenicol

**CIC:** Capacidad de Intercambio Catiónico

**CONICET:** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**CP:** Componente Principal

**CSP:** Proteína de Shock al Frío (*Cold Shock Protein*)

**DGGE:** Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

**DRX:** Difracción de Rayos X

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EFMV:** Enfermedades de la Madera de la Vid

**EG:** Etilenglicol

- ICDD:** Centro Internacional de Datos de Difracción (*International Centre for Diffraction Data*)
- ISO:** Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*)
- ITS:** Espacios Inter-génicos (*Internal Transcribed Spacer*)
- JCPDS:** Comité Conjunto sobre Estándares de Difracción de Polvo (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*)
- KSB:** Bacterias Solubilizadoras de Potasio (*Potassium-solubilizing Bacteria*)
- LFT:** Test de Flujo Lateral (*Lateral Flow Test*)
- LSD:** Diferencia Menos Significativa (*Least Significant Difference*)
- MANOVA:** Análisis Multivariado de la Varianza (*Multivariate ANalysis Of VAriance*)
- msnm:** Metros sobre el nivel del mar
- NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)
- NPK:** Nitrógeno-Fósforo-Potasio
- NMP:** Número Más Probable
- PMP:** Punto de Marchitez Permanente
- PCA:** Análisis de Componentes Principales (*Principal Component Analysis*)
- PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- PDA:** Agar Patata Dextrosa (*Potato Dextrose Agar*)
- PDF:** Archivo de Datos de Difracción (*Powder Diffraction Data*)
- PGPR:** Rhizobacteria Promotora de Crecimiento Vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*)
- RB:** Rosa de Bengala
- rpm:** Revoluciones por minuto
- SIR:** Respiración Inducida por Sustrato (*Substrate Induced Respiration*)
- SS:** Suelo Seco
- TAE:** Tris Acetato EDTA
- TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
- TSA:** Agar de Tripto-Caseína de Soja (*Trypto-Casein Soy Agar*)
- UCM:** Universidad Complutense de Madrid
- UPM:** Universidad Politécnica de Madrid
- UPV:** Universidad Politécnica de Valencia
- UFC:** Unidades Formadoras de Colonia
- USDA:** Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*)
- YMA:** Agar para observar la Morfología macroscópica de Levaduras (*Yeast Morphology Agar*)

# Resumen

El suelo se define como la parte más externa de la corteza terrestre y presenta un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. La porción inorgánica es importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. La materia orgánica que compone el suelo procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo. El resto del volumen del suelo está constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica.

Las interacciones que ocurren en el suelo vienen dadas por factores abióticos y bióticos. Entre los parámetros bióticos se encuentran; La capacidad de retención de agua en el suelo disponible para la planta, determinada mediante los parámetros Capacidad de Campo (CC) y Punto de Marchitez Permanente (PMP); Las variaciones de pH producidas por la actividad microbiana y la composición geoquímica del sustrato; Y la composición mineralógica del suelo, la cual se conecta estrechamente con los dos parámetros anteriores. Los parámetros bióticos que determinan la funcionalidad del suelo se miden de forma indirecta o directa. Una forma indirecta de inferir en la actividad microbiana del suelo es a través de la respiración (SIR) de los microorganismos que habitan en él. También el análisis de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa, reductasa, fosfatasa y proteasa) de la población microbiana del suelo indica la fertilidad del mismo. Para analizar de forma directa las poblaciones microbianas que se encuentran en el suelo se utilizan recuentos de microorganismos viables mediante técnicas clásicas de microbiología y análisis meta-taxonómicos.

La explotación del suelo mediante la práctica de la agricultura implica ciertos cambios en el sustrato. La aplicación de enmiendas y trabajos para procurar la oxigenación del suelo cambian las propiedades físico-químicas de este y, por tanto, modifican la población microbiana edáfica. En el caso de cultivos mono-específicos, como el vitivinícola, la explotación de una sola especie vegetal hace

más vulnerable al cultivo debido a que si una enfermedad prolifera contaminará rápidamente al resto de las vides. La procedencia de las enfermedades que se observan actualmente en viñedo proviene de cultivos cercanos o de plantones procedentes de vivero. Las enfermedades que presentan una mayor incidencia en *Vitis vinifera* son la yesca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Cadophora luteo-olivacea*), el pie negro (*Dactylonectria*, *Ilyonectria*), la eutipiosis (*Eutypa lata*) y el decaimiento (*Neofusicoccum*, *Diplodia seriata*). En la proliferación de estas EFMV el suelo podría presentar un papel importante actuando como reservorio.

En el presente trabajo se ha caracterizado el suelo de 15 parcelas vitícolas durante un periodo de 3 años, en los tres estados fisiológicos de la vid más relevantes (reposo, lloro y maduración). El análisis mineralógico, efectuado mediante difracción de rayos X (DRX), del suelo muestra parcelas con un contenido en cuarzo entre 4,0-16,4% y con un contenido en carbonatos como la calcita entre 11,2-39,6% y dolomita de entre 8,5-42,9%. El contenido de minerales con hábito hojoso, como las arcillas, se observa entorno al 36,1-50,1%. Estudios de proyectos anteriores definen 4 tipos taxonómicos de suelo, según la USDA: XEROFLUVENT, XERARENT, XERORTHENT y CALCIXEREPT. La agrupación USDA de suelos representaba una gran cantidad de parámetros, los cuales se encuentran redundantes para la clasificación local de los suelos estudiados. Así pues, la clasificación parcelaría supone la combinación lineal de las variables más resolutivas: arenas, arcillas y contenido de caliza activa. También se ha medido la capacidad de retención hídrica del suelo mediante CC y PMP. Los resultados observados de agua disponible (AD) para la vid en parcelas arenosas es  $19 \pm 12$  ml/kg, en parcelas arcillosas  $23 \pm 3$  ml/kg y en parcelas calizas  $14 \pm 3$  ml/kg. El AD en las parcelas arenosas fluctúa considerablemente debido a que la aplicación de enmiendas orgánicas puede potenciar la retención hídrica del suelo. Cabe destacar que el porcentaje de cuarzo del suelo obtenido mediante la técnica DRX se relaciona con CC ( $R=0,78$ ), pudiendo estimar de forma rápida la retención hídrica. Por otro lado, los valores de pH observados tienden a la alcalinidad, con valores mínimos de  $7,84 \pm 0,01$  y máximos de  $9,58 \pm 0,04$ .

En este trabajo también se ha analizado la microbiota viable del suelo mediante técnicas clásicas de microbiología. Se han observado unos valores promedio de recuento de bacterias heterótrofas significativos en lloro, respecto a maduración y reposo. En el caso de levaduras y hongos filamentosos, los valores promedio son estadísticamente significativos en reposo. Cabe destacar que la población de levaduras presenta un mayor recuento en suelos calizos que en arenosos. En el conteo de microorganismos de interés agrícola se observa que la

concentración de bacterias fijadoras de nitrógeno aumenta significativamente en lloro y maduración, igualmente ocurre con el recuento de bacterias movilizadoras de fósforo. La concentración de bacterias movilizadoras de potasio únicamente aumenta en lloro. En cuanto al recuento de bacterias amilolíticas se observa un aumento progresivo desde reposo hasta maduración, donde se observa la máxima concentración posiblemente por el almidón disponible en restos de poda que se mantiene en el sustrato. El recuento de bacterias proteolíticas y actinomicetos se reduce en reposo.

El análisis de la fertilidad del suelo se puede realizar también mediante indicadores o parámetros indirectos como son la respiración inducida por sustrato (SIR) y el análisis enzimático. El SIR medido en los suelos estudiados presentan un mínimo de 57,01 y un máximo de 356,47 mg de CO<sub>2</sub>/kg suelo/día. En las parcelas arenosas un pH > 8,9 reduce la actividad respiratoria se reduce entorno al 40 % comparadas con las parcelas arenosas con un pH < 8,9. Otro indicador de la fertilidad del suelo es el estudio enzimático. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se mantiene durante todo el estudio en niveles bajos (0,59 mU/g SS), lo cual indica aplicación de enmiendas libres de contaminantes. La actividad deshidrogenasa se encuentra, en promedio, entorno a 0,02-1,04 mU/g SS. También se ha medido la actividad proteasa, cuyo promedio se mantiene estable entre 0,5-1,0 mU/g SS, y la actividad fosfatasa alcalina con valor promedio de 0,8 $\pm$ 0,3 mU/g SS.

La diversidad bacteriana medida en el suelo mediante la técnica PCR-DGGE se encuentra en índice de Shannon de entre 0,60 y 2,57 bits. Dependiendo de la parcela estudiada los valores fluctúan indicando la diversificación de la comunidad bacteriana para la degradación de los diferentes nutrientes disponible en base a los diferentes estados fisiológicos de la vid. En el estado fisiológico de lloro los suelos presentan una mayor diversidad bacteriana que en el estado de reposo.

El estudio meta-taxonómico de las EFMV, tanto en madera como en suelo, revela que en el suelo de todas las parcelas analizadas se encuentran especies pertenecientes a la yesca. También se han detectado especies pertenecientes al género *Eutypa* (0,2 % de abundancia) en suelos arenosos. En cuanto al análisis de madera contaminada, se ha detectado una alta incidencia de yesca (17 %) y eutipiosis (52 %). También se han encontrado hongos fitopatógenos del género *Cladosporidium* y *Alternaria* en suelos trabajados en terrazas.

En el presente estudio se ha desarrollado una técnica para la detección rápida de *Cadophora luteo-olivacea* en madera con un umbral de detección de 10

pg de ADN fúngico. Mediante esta técnica de detección por PCR no es necesario el aislamiento del hongo fitopatígeno, siendo un método específico para monitorizar el viñedo de forma continua y anticipar las acciones correctoras pertinentes.

## Palabras clave

Suelo, enzimas, fertilidad, EFMV, PCR-DGGE, *Cadophora luteo-olivacea*, análisis meta-taxonómico, bacterias PGPR, vid, madera, SIR, *Vitis vinifera*.

# Abstract

The soil is defined as the outermost part of the earth's crust and presents an interaction system between three well-defined phases: (1) a solid phase, composed by mineral and organic matter; (2) a liquid phase and (3) a gaseous phase or soil atmosphere. The inorganic portion within the solid phase is important because of its influence on nutrient availability, aeration and water retention. The organic matter is made up by the activity of the living organisms in the soil. The rest of the soil volume contains porous spaces, which in turn are occupied by water and those gases within the soil atmosphere.

The interactions occurring within the soil are given by both abiotic and biotic factors. Among the biotic parameters are: (1) water retention capacity of the soil available to the plant, determined by the Field Capacity (FC) and Permanent Wilt Point (PWP) parameters; (2) variations in pH produced by the microbial activity and the geochemical composition of the substrate; and (3) the mineralogical composition of the soil, which is closely connected with the two previous parameters. The biotic parameters that determine the functionality of the soil are measured either indirectly or directly. One indirect way of inferring the microbial activity of the soil is through the respiration (SIR) of the microorganisms that inhabit it. Furthermore, the analysis of the enzymatic activity ( $\beta$ -galactosidase, reductase, phosphatase and protease) of the soil microbial population also indicates the degree of soil fertility. In order to analyse directly the microbial populations in the soil, counts of viable microorganisms are used using classic microbiology techniques and meta-taxonomic analysis.

The exploitation of the soil through agricultural practices imply certain changes in the substrate. The application of amendments and work to enhance soil oxygenation change the physical and chemical properties of the soil and, thus, modify the soil microbial population. In the case of monospecific crops such as wine, the exploitation of a single plant species make the crop more vulnerable due to disease proliferation and spreading to the rest of the vines. The sources of the diseases currently observed in vineyards are caused either

by nearby crops or nursery seedlings. The vine wood diseases (VWD) with the highest incidence in *Vitis vinifera* are esca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Cadophora luteo-olivacea*), blackleg (*Dactylonectria*, *Ilyonectria*), eutypiosis (*Eutypa lata*) and decay (*Neofusicoccum*, *Diplodia seriata*). Soil could play an important role in the proliferation of these wood diseases by acting as a reservoir.

In the present work, the soil of 15 vineyard plots has been characterised over a three-year period, taking into account the three most relevant physiological states of the vine (rest, weeping and ripening). The mineralogical analysis carried out by means of X-ray diffraction (XRD) of the soil showed plots with a quartz content between 4.0-16.4%, and a carbonate content of calcite between 11.2-39.6% and dolomite between 8.5-42.9%. The mineral content with a leafy habit, such as clays, is around 36.1-50.1%. Previous studies defined four taxonomic types of soil according to the USDA (United States Department of Agriculture): XEROFLUVENT, XERARENT, XERORTHENT and CALCI-XEREPT. The USDA soil classification involved a large number of parameters, which are redundant with the local classification of the soils studied. Therefore, the plot classification involves the linear combination of the most contributing variables: sands, clays and active limestone content. The water retention capacity of the soil has also been measured by means of FC and PWP. The observed results of available water (AW) in vines for sandy plots were  $19 \pm 12$  ml/kg, for clayey plots  $23 \pm 3$  ml/kg and for limestone plots  $14 \pm 3$  ml/kg. The AW in sandy plots fluctuated considerably because the application of organic amendments can enhance soil water retention. It should be highlighted that the percentage of quartz in the soil obtained by the XRD technique was related to FC ( $R=0.78$ ), and water retention can be quickly estimated. On the other hand, the pH values observed tended towards alkalinity, with minimum values of  $7.84 \pm 0.01$  and maximum values of  $9.58 \pm 0.04$ .

In this work, the viable soil microbiota has also been analysed using classical microbiology techniques. Significant pro-average heterotrophic bacteria counts have been observed in weeping, in comparison to maturation and resting. In the case of yeasts and filamentous fungi, the average values were statistically significant at resting. It should be noted that the yeast population presented a higher count in limestone soils than in sandy ones. While counting microorganisms of agricultural interest, it was observed that the count of nitrogen-fixing bacteria increased significantly in weeping and ripening, as it did the counting of phosphorus mobilising bacteria. The concentration of potassium mobilising bacteria only increases in weeping. Regarding to the count of amyolytic bacteria, a progressive increase was observed from resting to ripening, when the

maximum concentration was reached, possibly due to the starch available from pruning remains that are maintained in the substrate. The count of proteolytic bacteria and actinomycetes was reduced at rest.

The fertility analyses of the soil can also be carried out using indicators or indirect parameters such as substrate-induced respiration (SIR) and enzymatic analysis. The SIR measured in the soils studied present a minimum of 57.01 and a maximum of 356.47 mg of CO<sub>2</sub>/kg soil/day. In the sandy plots a pH>8.9 reduces the respiratory activity by about 40% compared to the sandy plots with a pH with a pH<8.9. Another indicator of soil fertility is the enzymatic study. The activity  $\beta$ -galactosidase was maintained during the whole study at low levels (0.59 mU/g SS), which indicates the application of pollutant-free amendments. The dehydrogenase activity is, on average, around 0.02-1.04 mU/g SS. Protease activity was also measured, with an average stable range of 0.5-1.0 mU/g SS, and alkaline phosphatase activity averaging 0.8±0.3 mU/g SS.

The bacterial diversity measured in the soil by the PCR-DGGE technique is in the Shannon index between 0.60 and 2.57 bits. Different plots showed the fluctuation of the studied values, indicating the diversification of the bacterial community because of the degradation of the different nutrients available based on the different physiological states of the vine. The physiological state of weeping, the soils presented a greater bacterial diversity than in the resting state. The meta-taxonomic study of the VWD, both in wood and in soil, revealed that species related to esca are found in all the soil plots analysed. Species belonging to the genus *Eutypa* (0.2% abundance) have also been detected in sandy soils. Regarding the analysis of contaminated wood, a high incidence of esca (17%) and eutypiosis (52%) was detected. Phytopathogenic fungi of the *Cladosporidium* and *Cladosporidium Alternaria* genus have also been found in soils while working on terraces. This study developed a technique for the rapid detection of *Cadophora luteo-olivacea* in wood with a detection threshold of 10 pg of fungal DNA. By means of this PCR detection technique, the isolation of the phytopathogenic fungus is not necessary, being a specific method to monitor the vineyard continuously and anticipate the relevant corrective actions.

## Keywords

Soil, enzymes, fertility, VWD, PCR-DGGE, *Cadophora luteo-olivacea*, meta-taxonomic analysis, PGPR bacteria, vine, wood, SIR, *Vitis vinifera*.



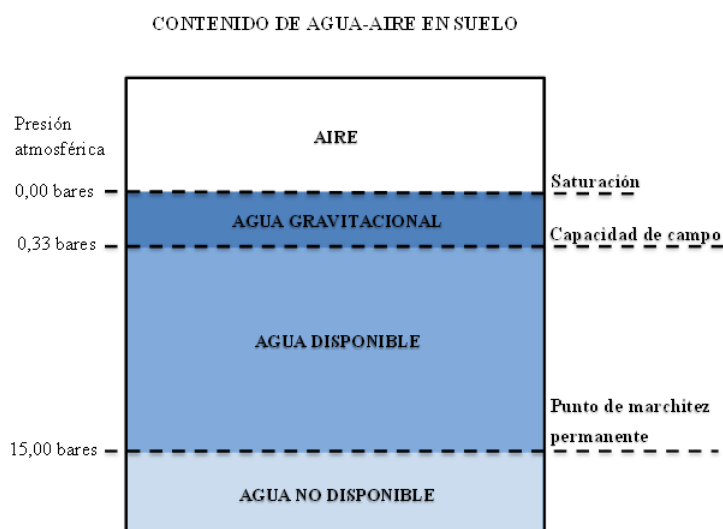
# I. INTRODUCCIÓN



# 1. EL SUELO

El suelo se define como la parte más externa de la corteza terrestre, resultante de la meteorización de las rocas subyacentes y con unas características claramente diferenciadas respecto a las rocas originales. Podemos considerar el suelo como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. El tipo y composición de la materia mineral viene dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación. La porción inorgánica es importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. La materia orgánica que compone el suelo procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo, su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal. El resto del volumen del suelo está constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica (Figura 1.1). La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica (*Science & Administration, 1975*).

El suelo tiene diversas funciones muy importantes para los ecosistemas terrestres y el medio ambiente del planeta: es el sustento para la vida vegetal y del cual las plantas obtienen soporte mecánico y la mayoría de sus nutrientes; es el hábitat para una gran diversidad de organismos, tanto microscópicos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoarios y virus), así como de otros animales (coleópteros, miriápodos, hormigas, colémbolos, nematodos, ácaros, larvas, mamíferos pequeños y reptiles) y es el nicho ecológico donde se llevan a cabo la mayor parte de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas terrestres (mineralización de la materia orgánica, nitrificación, fijación de nitrógeno, oxidación de metano y la movilización del fósforo entre otros procesos).



**Figura 1.1:** El suelo está constituido por materiales geológicos que lo definen y que determinan la proporción agua/aire que es capaz de acumular. En el sistema suelo-planta-atmósfera la presión mínima que ejerce la planta para adquirir agua es 0,33 bares y la máxima es 15,00 bares sobre la presión atmosférica. La diferencia de presión determina el agua útil que un suelo es capaz de ceder al cultivo (Alonso, 2016).

Los suelos vitivinícolas se caracterizan por ser pedregosos debido a su cercanía al entorno fluvial, el cual transporta materiales de mayor o menor volumen dependiendo del caudal, y se definen como suelos con baja o muy baja concentración de este ión potasio o sus sales (Van Leeuwen & Seguin, 2006).

## 1.1. Componentes abióticos en el suelo

Existen una serie de factores de naturaleza abiótica (factores físico-químicos) que confieren propiedades diferenciadas a los distintos suelos. En los suelos agrícolas existe una relación muy estrecha entre las propiedades físico-químicas del suelo y la ecología de las poblaciones microbianas que habitan en él (Calderón *et al.*, 2000; Okano *et al.*, 2004).

Hay que tener en cuenta que las reacciones químicas que se cursan en el suelo suceden en fase acuosa y, por tanto, es necesario tener en cuenta el contenido de agua y el movimiento preferencial de esta. La pluviosidad de la zona de estudio es el principal factor abiótico, enmarcado en la meteorología de la

zona, que condiciona el desarrollo vegetal y la composición de las poblaciones de microorganismos edáficos. El 70 % del agua dulce se destina a la producción agrícola (AQUASTAT, 2015), siendo la hidrografía cercana a la zona de cultivo la principal fuente de riego.

### 1.1.1. Capacidad de retención de agua del suelo

La cantidad de agua que almacena el suelo, relacionada con la cesión a la planta, está determinada por los siguientes parámetros: Capacidad de Campo (CC) y Punto de Marchitez Permanente (PMP). La CC se define como la cantidad constante de agua que contiene un suelo saturado después de 48 horas de drenaje y el PMP se define como el contenido de agua higroscópica de un suelo y que no se encuentra disponible para la planta. Es decir, la CC es la capacidad máxima que tiene un determinado suelo de retener agua y el PMP es la mínima cantidad de agua retenida y accesible para la planta. Por tanto, el Agua Disponible (AD) para el cultivo es la diferencia entre el agua retenida a CC y PMP (Shaxson & Barber, 2008).

### 1.1.2. Variaciones de pH en el suelo

Uno de los principales factores que determinan la funcionalidad desde un punto de vista microbiano de un suelo es el pH (Bååth *et al.*, 1995). La acidez o basicidad de un determinado suelo es, normalmente, dependiente de la composición biogeoquímica de este. Por tanto, este parámetro es una combinación del componente biológico y geológico del sustrato. Además de los dos componentes citados, las variaciones de pH dependen de la pluviosidad de la zona debido al desplazamiento o arrastre de sales por solvatación y de la orografía, la cual determina el cauce del agua sobre un determinado terreno. Si, por ejemplo, la zona de mayor altitud del cultivo se compone principalmente de dolomías el agua de escorrentía arrastrará los iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia zonas bajas, estas sales podrían modificar las poblaciones microbianas que se encuentran en el suelo. Si nos referimos a zonas en las que el suelo se compone, en mayor o menor medida, de sales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la disolución de estas sales desplaza a iones  $\text{Fe}^{2+}$  impidiendo que sean bio-disponibles para la vid. La falta  $\text{Fe}^{2+}$  produce clorosis férrica por competencia iónica, visible desde satélite en zonas marrones en el cultivo. Existe también un factor externo que modifica el pH del suelo: la aplicación de fertilizantes inorgánicos en el suelo de las parcelas agrícolas. Esta práctica modifica el pH del suelo acidificando el sustrato por sustitución catiónica. En casos donde se utilizan sales con cationes monovalente como el  $\text{KNO}_3$ , el pH potencial del suelo desciende acidificando el sustrato. Este proceso sustitutivo permite que un ion  $\text{H}^+$  adherido a una partícula, de arcilla o materia orgánica,

se desprenda y se sustituya por un ión  $K^+$ . Los  $H^+$  libres en el suelo provocará un descenso importante en los valores de pH.

### 1.1.3. Composición mineralógica del suelo

Como hemos visto anteriormente, la textura del suelo determina la capacidad de retención hídrica. Los minerales que componen un determinado suelo también influyen de manera directa en la permeabilidad y el pH del suelo. Por tanto, es indispensable conocer la fracción mineral de los suelos analizados en este trabajo. Para llevar a cabo una caracterización de la materia cristalina se necesitan técnicas basadas en la interacción onda-materia, en la que esta última responderá según sus características estructurales. De este modo, observando la respuesta y conociendo el fenómeno que la provoca, es posible deducir información sobre el material objeto de estudio. La difracción de rayos X permite determinar la distribución tridimensional de los átomos o moléculas que comprenden un cristal, la forma y dimensiones de la celdilla unidad, su contenido químico y el grupo espacial al que pertenece la sustancia; en suma, su estructura. En la difracción de rayos X, un material es irradiado con un haz de rayos X y sus átomos lo dispersan produciendo un diagrama de difracción (difractograma) específico, tan distintivo como una huella dactilar (Bragg & Bragg, 1913; Bragg, 1913). Por ello, constituye la base de muchos métodos de identificación mineral.

Los suelos contienen una mezcla de minerales de pequeño tamaño y, muchos de ellos, pertenecientes al grupo de los filosilicatos arcillosos, que nunca desarrollan cristales lo bastante grandes para estudiarlos aisladamente. Esto descarta el empleo de técnicas basadas en monocristal, en las cuales se hace necesario una composición cristalina uniforme como en el caso de la cristalización de aminoácidos. Así pues, a diferencia de los métodos que emplean un cristal único, para el método que se utiliza es necesario un material de partida policristalino formado por diminutos cristales orientados al azar en todas las direcciones posibles. Dicho polvo se irradia con una radiación monocromática e, indudablemente, siempre habrá partículas cristalinas que satisfagan la ley de Bragg y se generará un rayo difractado. Así pues, a diferencia de los métodos que analizan un cristal único, la difracción de rayos X, que se ha utilizado, es capaz de describir un material policristalino formado por diminutos cristales orientados al azar en todas las direcciones posible. Los detalles de dicha técnica están descritos detalladamente en la *Sección 4.3.3* del capítulo *MATERIAL Y MÉTODOS*.

En muchos casos, no se puede disponer de cristales suficientemente grandes para estudiarlos aisladamente. Es el caso de los filosilicatos arcillosos que difícilmente desarrollan monocristales, siendo en general agregados policristalinos de individuos de muy pequeño tamaño.

## 1.2. Componentes bióticos en el suelo

Las comunidades microbianas edáficas cumplen funciones fundamentales en el reciclaje de nutrientes y descomposición de materia orgánica. La estructura de estas comunidades y su abundancia se definen por las características físicas y químicas del suelo tales como la textura (Johnson *et al.*, 2003), el pH del suelo (Bååth *et al.*, 1995), el contenido en materia orgánica (Lejon *et al.*, 2007), la práctica agrícola que se haya realizado (Nicolardot *et al.*, 2007) y la cobertura vegetal (Lejon *et al.*, 2005). La actividad de estas comunidades microbianas, además de estar condicionada por los parámetros descritos, modifican la estructura y características fisicoquímicas del suelo como la humedad y el pH (Mustafa *et al.*, 2006; Nannipieri *et al.*, 2003).

La calidad del suelo es un término cada vez más usado para referirse a la interacciones de atributos físicos, químicos y biológicos relacionados con la capacidad funcional del suelo para sostener la productividad vegetal (Brejda *et al.*, 2000; Doran & Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 1997; Shober *et al.*, 2003). Dentro de los atributos biológicos, la microbiota edáfica determina la calidad del suelo para llevar a cabo prácticas agrícolas (Roper & Ophel-Keller, 1997). Esto es debido a que los microorganismos participan activamente en procesos de descomposición de la materia orgánica y la mineralización de nutrientes (Alexander, 1981). Por este motivo estos cambios el uso del suelo o las prácticas agrícolas que se aplican pueden influir sobre sus características físico-químicas (Bramley & White, 1989). Estas a su vez pueden provocar modificaciones en la estructura poblacional y funcional de la microbiota (Beare *et al.*, 1992; Mikhovskaya *et al.*, 1993).

Dicha microbiota constituye un componente muy lábil de la fracción orgánica, contiene del 1 % a 3 % del carbono total y hasta 5 % del nitrógeno total del suelo. Las características físicas, químicas y biológicas del suelo, así como la presencia de plantas, ejercen una fuerte influencia sobre el número y la actividad de las poblaciones microbianas.

Las comunidad bacteriana representa entre el 25 % y 30 % de la biomasa microbiana del suelo, comportándose como los organismos más numerosos del

suelo (entre  $10^6$  y  $10^7$  bacterias  $g^{-1}$  de suelo), mientras que los hongos filamentosos y levaduras, dado su mayor tamaño y presentando menor abundancia, suponen hasta un 80 % la biomasa microbiana (Olalde & Aguilera, 1998). Entre estos últimos microorganismos destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Verticillum*. Sus principales funciones son la degradación heterótrofa de los restos vegetales y la formación de simbiosis del tipo micorrízicas y relaciones de tipo parásitas.

Para entender la relación entre las poblaciones microbianas de un suelo y su efecto sobre la calidad y productividad del mismo es necesario diseñar y desarrollar métodos que permitan conocer el número de microorganismos de una muestra, el tipo de matriz en que se desarrollan y las relaciones microbianas en la muestra tratando los parámetros de biomasa y actividad microbiana como datos independientes (Atlas & Bartha, 2002). Por esta razón no es posible aplicar una metodología general para cualquier tipo de muestra de suelo. Así, es recomendable emplear métodos de recuentos directos e indirectos dependiendo del tipo de suelo. La comparación de recuentos microscópicos directos de células con los obtenidos en placas de cultivo ha puesto de manifiesto que al menos el 99 % de los procariotas presentes en el suelo son incapaces de desarrollarse en medios de cultivo (Roszak & Colwell, 1987; Torsvik *et al.*, 2002). Por lo tanto, la mayor parte de la diversidad procariota que integra la microbiota del suelo queda fuera del alcance de los métodos de estudio tradicionales, por no mencionar los hongos filamentosos y protistas, mucho más difíciles de cultivar en laboratorio. Una medida indirecta basada en el metabolismo de la microbiota edáfica es el estudio de las actividades enzimáticas del mismo. Las enzimas presentes en el suelo provienen principalmente de los microorganismos (Dick & Tabatabai, 1993). Por tanto, el estudio de la microbiota del suelo basado en la actividad enzimática parece ser la opción más apropiada para obtener información basada en la población edáfica en su totalidad.

### 1.2.1. Respiración de los microorganismos del suelo

La fracción biótica de la materia orgánica, formada por microorganismos vivos, desempeña un papel básico en los suelos al ser la última responsable del estado de la materia orgánica y, en general, del desarrollo y funcionalidad del ecosistema. Los microorganismos, por tanto, influyen sobre el ecosistema edáfico y su fertilidad, interviniendo tanto en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos como en la formación de la estructura de los suelos. La respiración del suelo es un proceso que refleja la actividad biológica del mismo, y se pone de manifiesto a través del desprendimiento de  $CO_2$  o del consumo de  $O_2$  resultante del metabolismo de los microorganismos vivos existentes en el

mismo. Así pues, una medida de respiración elevada indica una gran actividad aerobia microbiana en el suelo y, por tanto, es un buen indicador indirecto de fertilidad.

### 1.3. Indicadores bioquímicos de la fertilidad del suelo

Existen toda una serie de factores enzimáticos microbianos que permiten inferir la fertilidad del suelo. A continuación se presentan algunos de los más destacables indicadores que nos permiten realizar una estimación de la fertilidad del suelo analizado.

#### 1.3.1. Actividad $\beta$ -galactosidasa

La enzima  $\beta$ -galactosidasa pertenece al grupo de las enzimas glicosidasas sintetizadas por los microorganismos del suelo que interviene en el ciclo biogeoquímico del carbono, catalizando la liberación de azúcares de bajo peso molecular (glucosa y galactosa). La  $\beta$ -galactosidasa es una enzima poco estudiada, pero muy importante en la descomposición catalítica de las enmiendas orgánicas, como método para valorar el efecto de estas prácticas sobre la calidad del suelo. La medida de la inhibición de esta actividad es un ensayo rápido y eficaz para determinar la toxicidad de distintos compuestos xenobióticos sobre los microorganismos del suelo (hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenilos policlorados y algunos insecticidas de síntesis). Así, la actividad  $\beta$ -galactosidasa en muestras de suelos enmendados con residuos urbanos puede establecerse como un parámetro para el seguimiento y control del efecto contaminante sobre la microbiota edáfica y, en general, sobre el suelo (García Izquierdo, 2003).

#### 1.3.2. Actividad reductasa o deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa está ligada a la oxidación molecular de sustratos a través de la cadena de transporte de electrones microbiano. Así la actividad deshidrogenasa total depende de las distintas actividades deshidrogenasas parciales y tiene un papel fundamental en las etapas iniciales de la oxidación de la materia orgánica, por tanto es un indicador del sistema red-ox microbiano, por lo que suele considerarse un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo y un indicador general de la actividad microbiana del mismo. Se ha encontrado una buena correlación entre esta actividad y la respiración del suelo, aunque la estimación nunca podrá constituir una estimación del número de microorganismos (García Izquierdo, 2003).

### 1.3.3. Actividad fosfatasa

El fósforo es un nutriente fundamental para el desarrollo de las plantas y, en suelos cultivables, es un factor limitante de la productividad vegetal. Los suelos generalmente contienen cantidades significativas de fósforo del orden de 200 a 3000 mg·kg<sup>-1</sup>, pero apenas una pequeña proporción de este (<1 %) está disponible a las plantas de forma inmediata. Las formas orgánicas constituyen entre 20 % y 80 % del fósforo total e incluyen ésteres de inositol, nucleótidos y fosfolípidos. Las enzimas encargadas de la hidrólisis de los compuestos de fósforo orgánico reciben el nombre general de fosfatasas y son responsables de la hidrólisis de los enlaces en los ésteres fosfóricos (C-O-P), anhídridos fosfóricos (P-O-P) y fosfonatos (C-P) transformando estas formas de fósforo orgánico en inorgánico biodisponible para la planta. Las más estudiadas son las fosfomonoesterasas que se clasifican en ácidas y alcalinas de acuerdo al pH óptimo para su actividad catalítica, las ácidas son producidas por microorganismos y las raíces de las plantas, mientras que las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos (García Izquierdo, 2003). Por tanto, la medida de la actividad fosfatasa es un indicador de la fertilidad del suelo y permite estimar la mineralización de fósforo orgánico que estará disponible para la planta mediante la acción de esta enzima.

### 1.3.4. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica en el suelo permite la descomposición del nitrógeno orgánico contenido en las proteínas, es decir del nitrógeno orgánico. Este proceso catalítico supone la rotura de los enlaces peptídicos de proteínas presentes en el suelo liberando aminoácidos los cuales son altamente biodisponibles para la microbiota edáfica. El contenido proteico presente en el suelo está condicionado por el tipo de enmienda que se aplica en el suelo del viñedo. Siendo, en el caso de la aplicación de compost de oveja, los valores de nitrógeno orgánico entorno al 1-2 % del peso seco. Las enzimas proteolíticas en el suelo provienen, en gran parte, de los microorganismos que habitan en él, aunque también de residuos vegetales y de la microfauna edáfica. Por tanto, la aplicación de una enmienda orgánica será metabolizada, de forma más o menos eficiente, por la comunidad microbiana del suelo siendo un buen indicador de la fertilidad del suelo vitícola (García Izquierdo, 2003).

### 1.3.5. Diversidad microbiana en el suelo

El 90% de las especies bacterianas presentes en la naturaleza son no-cultivables (Colwell & Grimes, 2000) por tanto, no es posible su estudio mediante la utilización de técnicas microbiológicas clásicas, que implican crecimiento bacteriano. Es bien sabido que muchas de ellas ejercen efectos beneficiosos en la fertilidad del suelo pero es posible que no se hayan podido tener en cuenta debido a que podrían estar en estado de viable no cultivable o VNC. Especies como *Agrobacterium tumefaciens* o *Rhizobium leguminosarum* se pueden encontrar en estado de VNC en el suelo (Oliver, 2005). Estas especies son las responsables, en gran parte, de la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico en el suelo y por este motivo es necesaria la aplicación de técnicas genéticas o moleculares que permitan obtener información de todas las poblaciones microbianas presentes en los mismos.

Para el análisis de la diversidad microbiana en entornos edáficos explotados en monocultivo se han empleado técnicas moleculares basadas en la amplificación de secuencias génicas y su posterior resolución mediante geles de poliacrilamida en gradiente desnaturalizante o DGGE, como se describirá en *MATERIAL Y MÉTODOS (Sección 4.6.1)*. En este análisis, cada banda presente en el gel puede considerarse como indicador de la presencia de una especie bacteriana concreta, aunque con limitaciones por la posible superposición de bandas (comunicación personal). Se ha demostrado que los sistemas monocultivo como la explotación vitícola afectan negativamente a la cantidad de ADN extraído (Dequiedt *et al.*, 2011). También el tipo de suelo produciendo cambios en las bandas minoritarias, aunque las bandas con mayor señal se mantienen sin alteraciones (Gelsomino *et al.*, 1999). Además, y para suplir las limitaciones de esta técnica, se han analizado las muestras de suelo mediante técnicas de secuenciación masiva de la región V4 (ADNr 16S) perteneciente al dominio *bacteria*. Este análisis dependiente de amplificación mediante PCR, como en el caso anterior, permite la amplificación de la región V4 de la totalidad de las bacterias presentes en el suelo, de las cuales se ha extraído su ADN. De esta forma obtenemos la secuencia de cada una de las bacterias que se encontraban en la muestra y podemos cotejarla con la base de datos del NCBI para identificar el género.

Como método estadístico que permite estimar la biodiversidad de cada parcela se utiliza el índice de Shannon-Wiener (Shannon, 1948; Shannon & Weaver, 1949). Este índice no solo define la riqueza en especies, sino que permite obtener un valor del número de especies en relación a la población de cada especie. Este parámetro informa de cuántos efectivos y de cómo se encuentran distribuidos

en el suelo. En principio un mayor índice de biodiversidad bacteriana indica un suelo con mayores posibilidades o estrategias metabólicas permitiendo una mejor nutrición para la vid. Si bien es cierto que, en cultivos vitícolas antiguos, la población microbiana tiende a especializarse en este entorno. Este suceso puede dar lugar a una menor biodiversidad por especialización bacteriana llegando a un estado climácico.

## 2. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

### 2.1. Sistemas monocultivo

La explotación agraria pretende una producción vegetal rentable desde un punto de vista económico. Por este motivo en un mismo terreno se cultiva una única variedad o especie vegetal para homogeneizar los tratamientos en el campo y maximizar, de esta manera, la producción de alimentos. Este sistema intensivo presenta ventajas como la adecuación del riego a un determinado cultivo mono-específico o la recolección con una determinada maquinaria sin producirse cambios metodológicos. Estos cambios en la metodología pueden referirse a un viñedo en el cual el sistema de producción de uva es en espaldera, mediante poda en Cordon Royat (Figura 2.1). En este caso el sistema de recolección sería mediante una recolectora adaptada a esta forma de cultivo, la cual sería diferente a la recogida de trigo, por ejemplo. También se presentan inconvenientes en un cultivo mono-específico, por ejemplo, en el caso de que una determinada enfermedad o plaga sea específica de la especie vegetal en cuestión, esta se propagará rápidamente debido a la gran densidad de la misma especie vegetal. Incluso podrían encontrarse patógenos de otras especies vegetales que infecten casualmente el cultivo por similitud con otras especies diana para el patógeno. Por lo tanto este sistema de cultivo debe permanecer en constante vigilancia para controlar cualquier signo de enfermedad antes de que se propague de manera irreparable. Dependiendo de si la especie vegetal es anual como el trigo (su ciclo vegetativo presenta una duración de un año) o se trata de especies que permanecen cultivadas durante años como la vid (el ciclo vegetativo de la planta se alarga durante años) las pérdidas en el caso de una enfermedad serán de diferente calibre. En el caso del un cultivo anual



**Figura 2.1:** Cultivo en espaldera de vid guiado mediante el sistema de poda *Royat doble*. Recurso extraído de la web [www.vitivinicultura.net](http://www.vitivinicultura.net).

se perdería la cosecha de un sólo año pero en el caso de cultivos explotación pluri-anual, como la vid, se perdería la cosecha del año actual y de los sucesivos, teniendo que replantar el terreno y por tanto el rendimiento de la producción se vería afectado durante varios años.

El cultivo intensivo de una especie vegetal implica también ciertos cambios en el sustrato. La calidad de estos suelos se puede ver alterada debido por la práctica agraria (Granatstein & Bezdicek, 1992). Cuando se habla de calidad del suelo no sólo nos referimos a la textura del suelo o al pH de este sino también a la comunidad microbiana que habita en él. Los microorganismos que se encuentran en el suelo son esenciales en la evaluación de la calidad y participan en procesos de mineralización de nutrientes activamente, como se detallará en los siguientes capítulos.

Nuestro trabajo se ceñirá en el cultivo de la vid, que es plurianual, estudiando o analizando las patologías que pueden sufrir las vides y dañar al cultivo, ya que hemos visto que esto afectará a la producción de varios años. *Vitis vinifera L.* es una de las plantas más antiguas que se han cultivado (Schmid *et al.*, 2011). El cultivo vitícola destinado a vinificación se extiende en 7,4 millones de hectáreas en el mundo (FAO, 2018), representando España el 13% del cultivo mundial con una extensión de 858.976 ha en el año 2019, incluyendo cultivo de secano y regadío (Tabla 2.1).

En una parcela vitícola, en la cual el cultivo de vid puede mantenerse durante años ininterrumpidamente, el suelo mantiene una cierta uniformidad en cuanto a poblaciones microbianas ya que estas se han adaptado a los cambios en el suelo por la práctica agrícola. Para el mantenimiento de la calidad del suelo en monocultivo se aplican enmiendas orgánicas que permitan nutrir a la población microbiana del suelo, para que posteriormente la vid adquiera los nutrientes mineralizados (Cooperband, 2002; Goyal *et al.*, 1999).

**Tabla 2.1:** Superficie de viñedo en España agrupado por diferentes usos del cultivo. Recurso extraído del [Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación](#).**VIÑEDO**

VIÑEDO: Resumen nacional de la superficie (hectáreas), 2019

Cultivo	Superficie en plantación regular					Arranques en el año	Plantaciones nuevas en el año
	Total			En producción			
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío		
<b>VIÑEDO DE UVA DE MESA</b>							
En cultivo único	1.197	13.429	14.626	1.115	12.784	471	726
En cultivo asociado	30	9	39	30	8	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>1.227</b>	<b>13.438</b>	<b>14.665</b>	<b>1.145</b>	<b>12.792</b>	<b>471</b>	<b>726</b>
<b>VIÑEDO DE UVA PARA VINIFICACIÓN</b>							
En cultivo único	644.934	267.055	911.989	609.211	241.443	19.810	13.996
En cultivo asociado	8.043	493	8.536	7.869	453	265	-
<b>TOTAL</b>	<b>652.977</b>	<b>267.548</b>	<b>920.525</b>	<b>617.080</b>	<b>241.896</b>	<b>20.075</b>	<b>13.996</b>
<b>VIÑEDO DE UVA PARA PASIFICACIÓN</b>	1.698	-	1.698	1.698	-	-	-
<b>VIVEROS DE VIÑEDO</b>	136	1.367	1.503	-	-	-	-
<b>TOTAL VIÑEDO</b>	<b>656.038</b>	<b>282.353</b>	<b>938.391</b>	<b>619.923</b>	<b>254.688</b>	<b>20.546</b>	<b>14.722</b>

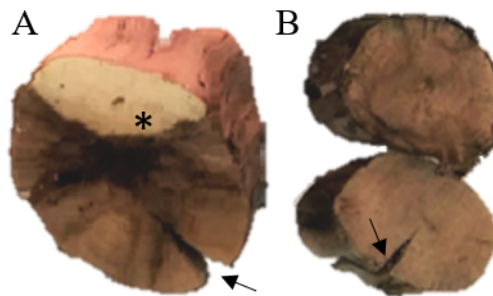
## 2.2. Producción vegetal destinada a la explotación agraria

Los requerimientos necesarios para la obtención productiva de un determinado vegetal están en parte determinadas por su ciclo biológico. Las especies vegetales con ciclo vegetativo anual (como las gramíneas o leguminosas) no necesitan de un sistema que permita la propagación de plántulas, únicamente se siembra la semilla y una vez crecido el vegetal se extrae la cosecha. Si bien para un cultivo de plantas anuales no se precisa de un servicio externo que ofrezca plantas jóvenes, para la explotación vitícola se hace necesario un proveedor de plantas jóvenes. No se parte de una semilla sino que es necesario la utilización de una técnica reproductiva asexual a partir de una planta donante denominada multiplicación vegetativa. Esta técnica conserva las características genéticas de las plantas asegurando la homogeneidad del cultivo, por tanto las vides plantadas son clones. La producción de vides jóvenes se realiza mediante injerto. Se obtiene una vara de la vid donante, resistente a la filoxera, y en este se injerta la variedad que se desee producir. Este proceso se realiza en viveros que se dedican exclusivamente a la producción de plantones de vid por reproducción asexual. En España se destinan un total de 1.503 ha de superficie a viveros de viñedo (Figura 2.1).

### 2.3. Enfermedades de la madera de la vid

Como ya se ha mencionado anteriormente, los cultivos pluri-anales están condicionados por la aparición de enfermedades que pueden mermar la producción durante varias vendimias. Las enfermedades de la madera de la vid son producidas mayoritariamente por hongos filamentosos, aunque también existen enfermedades bacterianas. Son cuatro las enfermedades fúngicas que presentan una mayor incidencia en las explotaciones vitícolas: Yesca, Pie Negro, Eutipiosis y Decaimiento. Estas afectan no solo al viñedo maduro, si no que pueden afectar al viñedo más joven que reemplace al enfermo. Estas enfermedades son crípticas y sus síntomas son normalmente desarrollados durante años.

La enfermedad de Petri es causada principalmente por distintas cepas de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Cadophora luteo-olivacea* y el género *Phaeoacremonium* (destaca la especie *P. minimum*); es una de las enfermedades más agresivas y que más nivel de mortalidad causa en el viñedo más joven. Los agentes causantes de esta enfermedad se pueden encontrar en el material de propagación aparentemente sano, resultando este una de las principales vías de propagación de la enfermedad. Sintomatológicamente, afecta a la parte basal del plantón colonizando el xilema (Figura 2.2). Los síntomas externos afectan a la parte aérea de la planta: el follaje es poco denso, las hojas presentan clorosis y bordes necróticos, y en ocasiones, el desarrollo del tronco es escaso.



**Figura 2.2:** Madera de vid de diferentes plantas (A, B) afectada por Yesca o enfermedad de Petri. El oscurecimiento de la madera (\*) y la apertura longitudinal del tronco por cavitación (→) indican un proceso avanzado de la infección.

El Decaimiento es causado por hongos filamentosos de la familia *Botriospaeriaceae* exclusivamente, de la que se han descrito hasta 21 especies causantes de esta enfermedad, destacan: *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum parvum*. Los principales síntomas externos se aprecian en las ramas, estas se comienzan a secar, disminuyen su porte y presentan un bajo porcentaje de apertura de yemas. Los síntomas foliares son característicos en etapas más tardías de la enfermedad, produciéndose necrosis internodales y deformación de estas. En cortes longitudinales de la madera se observan necrosis y decoloraciones sectoriales del tronco principal (también en los brazos si se trata de planta adulta), lo que provoca el secado y la muerte de la planta.

Las principales vías de entrada de patógenos en este caso es la vía aérea, entrando a la planta a través de heridas de poda, zonas de injerto, heridas de insectos, posiblemente transportados por acción de factores climáticas como el viento desde el suelo. Indudablemente el material de propagación del viñedo (plantones, púas y porta-injertos) es una de las vías de dispersión de estos patógenos. Tanto la planta madre como las púas empleadas en el proceso de obtención de plantones pueden estar infectadas y contribuir a la entrada del patógeno en el viñedo que las recibe. A pesar de emplear materiales de origen sanos, el proceso de propagación también puede ser crítico ya que en el procedimiento de obtención de plantones se producen numerosas heridas que pueden ser vía de entrada de patógenos. Todas estas infecciones a nivel de vivero pueden permanecer latentes hasta que la cepa se expone a situaciones de estrés y/o condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad una vez que esta se encuentre ya en el viñedo. La complejidad de las enfermedades de madera se asocia a la enorme diversidad de hongos patógenos que las pueden provocar, la existencia de un periodo indeterminado de latencia (periodo asintomático), los síntomas foliares erráticos y la falta de estrategias de control. Por estas razones, existe una creciente demanda de desarrollo de técnicas moleculares para una simple, rápida y fiable detección de éstos patógenos. Se han descrito numerosas técnicas, entre ellas, procedimientos que implican la detección de moléculas como fitotoxinas o moléculas de señalización temprana, así como técnicas que implican el uso de suspensiones celulares o callos. La técnica que se ha descrito como más sencilla, sensible y reproducible es la detección por PCR de los grupos, géneros o especies que causan una determinada enfermedad. Las técnicas de detección por PCR implican el diseño, validación y puesta a punto de cebadores específicos para cada hongo filamentosos (o grupo de hongos) que se asocian a una determinada enfermedad de la madera de la vid.

CAPÍTULO 2. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

### 3. EL SUELO COMO RESERVORIO DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE PATOLOGÍAS VEGETALES

El suelo alberga microorganismos de vital importancia para la mineralización de las enmiendas aplicadas en un viñedo. De todos los microorganismos encontrados en el suelo, entre el 1 y el 35% de los cultivables muestran antagonismo contra patógenos, mientras que dos terceras partes promueven el crecimiento vegetal (Singh *et al.*, 2011). Estos últimos pueden proveer tanto macro como micronutrientes, liberar fósforo de compuestos orgánicos como fitatos, modificar el pH del suelo, sobre todo del que rodea a la raíz, aumentando de ese modo la disponibilidad de fósforo y otros elementos además de la producción de sideróforos que facilitan la captación de hierro (Berg & Smalla, 2009). Por todo ello, debería dedicarse una mayor atención al estudio de las interacciones planta-microorganismos a fin lograr un manejo sustentable de la fertilidad del suelo y la producción de los cultivos (Garg & Chandel, 2011).

Actualmente, el aumento en la aparición de patógenos desafían el estado sanitario de los cultivos (Miller *et al.*, 2009). Estos patógenos se alojan en el suelo siendo este un posible reservorio de patógenos, en su mayoría pertenecen al grupo de los hongos filamentosos, que son (o podrían ser) patógenos de la madera de la vid. El género *Fusarium* se encuentra en el suelo y produce pudrición radicular, aunque en este caso *Fusarium* provoca un daño vegetal ocasional debido a su localización cosmopolita en el suelo (Funnell-Harris & Pedersen, 2011). Otros hongos filamentosos pertenecientes al género *Alternaria* (Roco & Pérez, 2001) y *Aspergillus* (Tran-Dinh *et al.*, 2009) que residen en suelo pueden ocasionar procesos infectivos en otros cultivos pero en madera de

vid sólo se encontrarían de forma ocasional e infectarían a la planta en una situación de estrés vegetal (por una infección primaria, falta de hidratación, etc).

Aunque los hongos filamentosos citados anteriormente pueden provocar alteraciones en madera de vid, existen cuatro enfermedades fúngicas distintas con una elevada incidencia: Yesca, Pie Negro, Eutipiosis y Decaimiento. La Yesca se compone de un consorcio de hongos fitopatógenos siendo *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea* las especie más representativas de esta enfermedad. Esta enfermedad ha detectado en suelos vitícolas (Saccà *et al.*, 2018) produciendo infección en madera de vid (Corti *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2020) con síntomas como decoloraciones internerviales y en los bordes de las hojas. *Dactylonectria* e *Ilyonectria* son los principales géneros de hongos filamentosos que causan la enfermedad de pie negro. La presencia en suelos de *Ilyonectria torresensis* se ha documentado en suelos vitícolas como la especie más común asociada a enfermedades en viñedos de Italia (Carlucci *et al.*), Portugal (Reis *et al.*, 2013) y España (Tolosa-Almendros *et al.*, 2016). El agente causal que produce Eutipiosis en madera de vid se trata de la especie *Eutypa lata*. Si bien no se publicado ninguna evidencia de su detección en suelo hasta el momento, si se ha detectado en madera de vid mediante técnicas moleculares (Catal *et al.*, 2007; Lardner *et al.*, 2005). La familia *Botryosphaeriaceae*, a la cual pertenece los géneros *Neofusicoccum* y *Diplodia seriata*, es la causante de forma exclusiva de la enfermedad de Decaimiento en vid. Se ha detectado su presencia en madera de vid mediante técnicas basadas en PCR (Spagnolo *et al.*, 2011), aunque en suelo es probable que se pudiera detectar su presencia no existen trabajos científicos que lo verifiquen.

Dado que el suelo es un material complejo que puede actuar como reservorio de algunos hongos fitopatógenos, se hace necesario el uso de herramientas de secuenciación masiva las cuales ofrecen un panel de géneros de hongos filamentosos que se encuentran presentes en suelo y madera. Esta técnica se usa para determinar la presencia de los hongos fitopatógenos descritos en suelo, comprobando de esta forma si el suelo actúa efectivamente como reservorio de estos.

## II. OBJETIVOS



Actualmente existe gran preocupación por el estado fitosanitario de las vides debido al aumento del número de casos en los cuales se tiene que retirar la planta del cultivo debido a infecciones en la madera, tanto en plantas jóvenes como adultas. Los patógenos que participan en estas infecciones pueden ser de un único género, por ejemplo, Eutipiosis o la pudrición por *Alternaría spp.*, o puede deberse a la asociación de distintos géneros para producir la infección como ocurre en la Yesca.

Para alcanzar una definición precisa de las variables que favorecen o dificultan el proceso infectivo es necesario obtener un gran volumen de datos de la microbiota del suelo y de la vid. Este estudio se ha realizado atendiendo a diferentes condiciones ambientales asociadas con el estado fisiológico de la vid: reposo, lloro y maduración.

El conocimiento de la distribución poblacional de las especies patógenas de la madera y su interacción/correspondencia con las poblaciones microbianas edáficas es de gran interés para la determinación de cuáles son los índices de biodiversidad saludables para la vid y poder anticipar o describir un posible futuro escenario de patogenia.

Por tanto, en este trabajo vamos a desarrollar los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el suelo vitícola mediante la determinación de su capacidad de retención hídrica, el análisis de su potencial electroquímico y el estudio cualitativo de la fracción mineral que lo compone.
2. Monitorizar las comunidades microbianas relacionadas con la movilización de nutrientes presentes en el suelo y que afectan a las fertilidad del mismo mediante técnicas microbiológicas clásicas. Cuantificar los principales grupos microbianos viables que permiten la nutrición de la vid mediante procesos catalíticos, transformando las enmiendas aplicadas en moléculas biodisponibles.

3. Cuantificar las actividades enzimáticas, presentes en el suelo, que participan en los ciclos biogeoquímicos más importantes (nitrógeno, carbono y fósforo). Determinar cuales son los parámetros enzimáticos más significativos presentes en suelos vitícolas como indicadores indirectos que informen sobre cambios producidos en estos por modificación de las poblaciones microbianas o bien por la adición de enmiendas orgánicas.
4. Identificar las poblaciones microbianas más significativas presentes en el suelo y en madera de vid con signos evidentes de infección activa para obtener conocimiento de la microbiota presente en ambos hábitats. Analizar mediante técnicas meta-taxonómicas las poblaciones microbianas asociadas al viñedo, haciendo especial mención a los reservorios de patógenos presentes entre la microbiota edáfica.
5. Analizar las variables físicas, químicas y biológicas del suelo edáficas para establecer una ordenación funcional de parámetros abióticos relacionados con variables bióticas.
6. Cuantificar e identificar la población hongos filamentosos endófitos relacionados con las EFMV en plantas jóvenes de *Vitis vinifera* mediante técnicas clásicas como moleculares.
7. Desarrollar y optimizar una técnica de diagnóstico rápido basada en la detección molecular de aquellas cepas de hongos fitopatógenos que presenten una mayor incidencia en las enfermedades de madera de vid.

Los objetivos planteados pretenden analizar cómo las variaciones de los distintos parámetros analizados (físicos, químicos y biológicos) influyen en la productividad y calidad vitivinícola de cada una de las parcelas explotadas.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS



## 4. ANÁLISIS DE SUELO DE LAS PARCELAS VITÍCOLAS

En este capítulo vamos a describir qué procedimiento se llevó a cabo para la recogida y correcta conservación de las muestras de suelo. También se detallan las técnicas y los procedimientos de los diferentes análisis físico-químicos realizados como son: las medidas del pH del suelo, la capacidad de retención hídrica del suelo y la caracterización mineralógica del suelo.

### 4.1. Toma de muestras de suelo y transporte

Las muestras de suelo se recogieron de 15 parcelas agrupadas en fincas con la denominación: PDC, Pago de Carraovejas; PSTM, Pico de Santa María; T, Terrazas; V, Vallejos; E, Espantalobos y A, Arenosas (Figura 4.1). Estas parcelas se encuentran en un viñedo localizado en el municipio de Peñafiel, Valladolid ( $41^{\circ}35'40,0''N$   $4^{\circ}05'15,2''O$ ). El perfil climático de esta región, según la clasificación Köppen-Geiger, se define como Csb (Mediterráneo con influencia oceánico). La temperatura media anual es de  $12,7^{\circ}C$  y la precipitación media anual de  $433\text{ l/m}^2$  (AEMET, estación 2166Y), con una altura promedio de 756 msnm. Las parcelas, localizadas próximas a la bodega, ocupan una superficie de 160 ha (Tabla 4.1).

Cada parcela cuenta con una estación meteorológica que recoge variables climatológicas diariamente: la velocidad del viento (km/h), temperatura atmosférica y del suelo ( $^{\circ}C$ ), radiación ( $W/m^2$ ), presión atmosférica (atm), humedad relativa de la atmósfera (%HR) y la humedad del suelo. Se planificó la recogida de muestras a 0,50 m de la estación y entre 0,05 y 0,25 m de profundidad para extraer la máxima densidad celular (Raynaud & Nunan, 2014). Previamente se eliminaron los restos de material vegetal o de rocas que impidieran

la recogida en la parte superficial. Se extrajeron 3 sub-muestras de 500 g de suelo realizando una zanja en forma de “V” con una pala plana de  $25 \times 25$  cm. Para evitar contaminación cruzada entre parcelas, la pala se limpió con alcohol absoluto y seguidamente se eliminan los restos de alcohol con agua destilada estéril antes de la recogida de cada muestra. Las muestras de suelo se transportaron en bolsas de polietileno herméticas etiquetadas y protegidas de la radiación solar. Se recogieron muestras de suelo durante los años 2015, 2016, 2017 y 2018. En el caso de 2015 y 2016 la toma de muestras de suelo se realizó en 12 parcelas (PDC01, PDC09, PDC11, PDC12, PDC13, PSTM02, PSTM05, PSTM08, T03, V03, V06 y V07) en los tres estados fenológicos de la vid: reposo (diciembre-enero), lloro (mayo-junio) y maduración (septiembre). Por otro lado, en el año 2017 y 2018 se efectuaron tomas de muestras en las parcelas PDC09, PSTM02, T03 y V06, ya estudiadas anteriormente y se incluyen las parcelas E15, E04 y A05. La frecuencia de la recogida se fijó en dos tomas de muestras en verano e invierno (definiendo verano entre los meses de junio-julio e invierno entorno a diciembre-enero).

**Tabla 4.1:** Localización en coordenadas sexagesimales (grados, minutos, segundos), altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm) y pendiente media de las parcelas vitícolas estudiadas. El código o etiqueta alfanumérico informa del nombre del grupo de parcelas (PDC: Pago de Carraovejas, PSTM: Pico de Sta. María, T: Terrazas, V: Vallejos, E: Espantalobos y A: Arenosas) y, dentro del grupo, el número informa de la contigüidad entre parcelas.

	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Pendiente (%)
<b>PDC01</b>	41°35'48,86" N	4°5'44,85" O	763	13
<b>PDC09</b>	41°35'42,65" N	4°5'25,48" O	775	13
<b>PDC11</b>	41°35'28,74" N	4°5'5,61" O	776	14
<b>PDC12</b>	41°35'39,67" N	4°5'9,80" O	807	27
<b>PDC13</b>	41°35'38,43" N	4°5'8,36" O	806	27
<b>PSTM02</b>	41°36'25,62" N	4°6'12,94" O	754	3
<b>PSTM05</b>	41°36'33,89" N	4°5'56,15" O	769	11
<b>PSTM08</b>	41°36'13,24" N	4°6'12,74" O	756	3
<b>T03</b>	41°36'15,47" N	4°5'43,99" O	823	17
<b>V03</b>	41°35'55,72" N	4°5'51,96" O	762	5
<b>V06</b>	41°36'8,41" N	4°5'55,21" O	779	7
<b>V07</b>	41°36'2,88" N	4°5'48,90" O	775	16
<b>E04</b>	41°35'11,50" N	4°5'15,70" O	778	1
<b>E15</b>	41°35'20,40" N	4°5'35,10" O	777	18
<b>A05</b>	41°35'53,10" N	4°3'17,30" O	897	0



**Figura 4.1:** Localización de los puntos de muestreo del suelo, coincidente con las estaciones meteorológicas.

## 4.2. Tratamiento y conservación de las muestras de suelo

La correcta conservación de las muestras de suelo es de gran importancia para que los datos obtenidos en los análisis sean veraces y reproducibles. Para conservar adecuadamente las muestras de suelo se siguió la metodología descrita en la norma ISO11464:2006 en la cual la preparación de las muestras de suelo para su conservación comienza por el secado según la norma ISO11464:2006. Según esta norma, el suelo debe depositarse en una bandeja formando una capa no superior a 5 cm. Posteriormente se seca al aire o en estufa siempre que no supere los  $40^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el suelo seco se tamiza con un cedazo metálico (luz de malla  $<2$  mm) higienizado con etanol 70 % v/v para obtener una fracción particulada. Para asegurar la representatividad muestral de cada parcela se utiliza un procedimiento llamado cuarteado. Las submuestras se mezclan para obtener homogeneidad en la composición del suelo, obteniendo una muestra total. Posteriormente, la muestra se divide en cuatro partes iguales o cuadrantes. Las dos partes diagonales se mezclan de nuevo y las otras dos se descartan. Este procedimiento se repite hasta obtener la cantidad adecuada para los análisis posteriores. El suelo procesado (tamizado y cuarteado) se conservó refrigerado ( $4^{\circ}\text{C}$ ) en bolsas herméticas de polietileno y con el menor

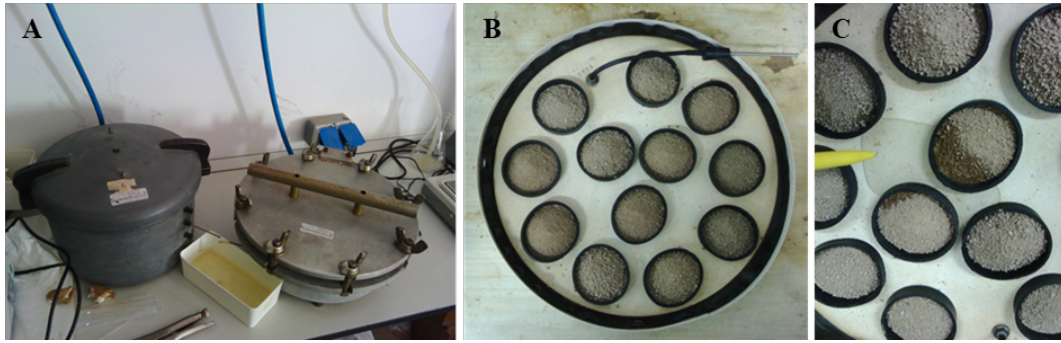
aire posible en su interior (Paetz & Cröβmann, 1994). El refrigerado asegura la estabilidad de las muestras para posteriores análisis enzimáticos, recuento de microorganismos viables y respiración inducida por sustrato (SIR). Para el análisis meta-taxonómico las muestras de suelo se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  desde su llegada al laboratorio, y hasta su procesado. De esta forma se evitaron las posibles modificaciones en la poblaciones microbianas presentes en la muestra, preservando la integridad del ADN de la acción de enzimas DNAsas (BRENDA; EC 3.1. [11, 21,22].n).

### 4.3. Parámetros físico-químicos del suelo

Algunos parámetros físico-químicos del suelo son importantes para este estudio porque, según se mencionó en la introducción, estos parámetros pueden modificar la composición, cuantitativa y cualitativamente, de la microbiota edáfica. En relación a la capacidad de retención de agua se definen a continuación la Capacidad de Campo (CC) y el Punto de Marchitez Permanente (PMP). La cantidad de agua en el suelo modifica la tensión de oxígeno presente en este negativamente debido al volumen ocupado. También se detallan cómo las variaciones de pH pueden condicionar el establecimiento de una determinada comunidad microbiana. Y de cómo la composición mineralógica del suelo se relaciona con la cantidad de agua presente en un suelo y la tendencia ácida o básica del mismo.

#### 4.3.1. Determinación de la Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente

Los parámetros hídricos de un suelo informan de la capacidad de retención del agua y su disponibilidad para la planta, por tanto, es necesario conocer el agua disponible en un suelo para mantener una hidratación vegetal óptima. Un suelo presenta dos límites definidos en retención de agua: un máximo de retención o saturación y un mínimo o xerófito. En el primer caso, un suelo saturado se define como aquel que ha perdido todo el agua gravitacional (el agua que se pierde únicamente por la aceleración de la gravedad). A diferencia de saturación, la Capacidad de Campo (CC) es un parámetro hídrico que simula la cesión de agua del suelo a 0,33 bares. Para ello, se depositaron 10,00 g de cada una de las muestras de suelo en una membrana de porcelana (Figura 4.2B). Posteriormente se llevaron a saturación hídrica con agua bi-destilada (Figura 4.2C). A continuación, mediante la inyección de aire seco con una presión de 0,33 bares en la cámara de Richards (Figura 4.2A), se eliminó el agua excedente hasta llegar a CC.



**Figura 4.2:** Sistema de extracción de agua mediante sobrepresión de aire seco con cámaras de Richards. **A:** Cámaras de Richards; la cámara de la izquierda trabaja a una sobrepresión de 0,33 bares y la de la derecha a 15,00 bares. **B:** Plataforma porosa en la cual se depositan las muestras de suelo delimitadas por una banda de 1 cm de altura. **C:** Saturación de las muestras de suelos con agua bi-distilada.

El agua disponible en un suelo se define en un intervalo volumétrico entre la capacidad de retención hídrica a 0,33 bares de sobrepresión (CC) y la retención de agua a 15,00 bares de sobre presión atmosférica (Punto de Marchitez Permanente). Dependiendo de las características texturales, un suelo permite una cesión de menor o mayor cantidad agua a la planta a una presión determinada. Por este motivo, se realizó un análisis para determinar el Punto de Marchitez Permanente (PMP). Para calcular el PMP se hidrataron las muestras hasta saturación y posteriormente se les aplicó una presión de 15,00 bares para eliminar el agua sobrante (Figura 4.2). Ambos tratamientos, CC y PMP, se aplicaron durante 24h y posteriormente se eliminó el agua contenida en cada muestra siguiendo la normativa ISO 11465:1993. Este normativa describe un secado de la muestra a  $105 \pm 5$  °C durante un mínimo de 30 min, realizando seguidamente el estudio gravimétrico hasta pesada constante, para determinar la cantidad de agua disponible para la vid.

Mediante la siguiente expresión se obtiene el valor CC o PMP:

$$m_{CC/PMP} = (m_{SH} - m_{SS})/m_{SS}; \text{ (ml agua}^1 \text{ / kg suelo);}$$

Donde:

$m_{CC/PMP}$ : Contenido gravimétrico de humedad en el suelo a CC o PMP.

$m_{SH}$ : Masa de la muestra de suelo sometido a -0,33/-15,00 bares de presión.

$m_{SS}$ : Masa de la muestra secada a 105°C hasta medida constante.

---

<sup>1</sup> $\rho_{H_2O} = 1000 \text{ kg/m}^3$

Por último se define el Agua Disponible (AD) para la planta simplemente por diferencia entre CC y PMP:

$$AD = CC - PMP; \text{ (ml agua / kg suelo)}$$

### 4.3.2. Determinación de parámetros electroquímicos del suelo: medidas de pH en H<sub>2</sub>O, KCl y CaCl<sub>2</sub>

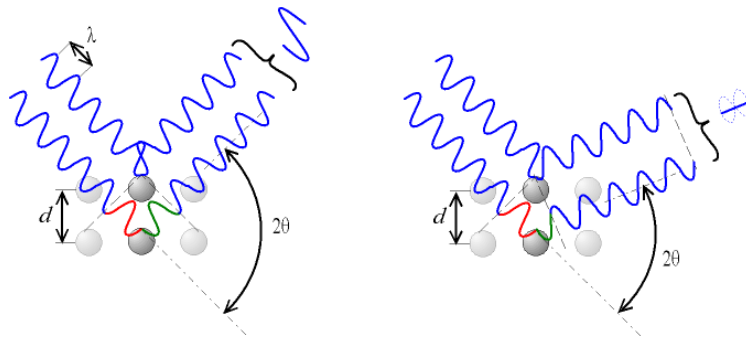
El potencial electroquímico (mV) del suelo influye en gran medida en el establecimiento de una comunidad microbiana determinada. Además condiciona la biodisponibilidad de iones para los organismos que habitan en él. Un buen ejemplo del secuestro de iones sería lo ocurrido cuando el suelo se satura de sales cálcicas por lavado estacional en la temporada de lluvias, desplazando al hierro y provocando clorosis férrica en las vides, visible por un amarilleamiento de las hojas. El pH de las muestras se determinó siguiendo la norma ISO 10390:2005. En la citada norma, el pH del suelo se determina en suspensión manteniendo una fracción volumétrica 1:5 (sólido:líquido) en agua miliU (conductividad  $\sigma > 0,2$  mS/m (miliSiemens por metro) y un  $\text{pH} \leq 5,6$  a 25 °C), en cloruro potásico 1,0 M (KCl) y en cloruro cálcico 0,01 M (CaCl<sub>2</sub>). Posteriormente se homogeneizan en un agitador orbital no menos de 30 minutos ni más de 90 minutos. Finalmente el pH del suelo en suspensión se mide con el equipo CRISON BASIC 20. La razón de utilizar diferentes soluciones para las medidas se debe a la necesidad de simular las siguientes condiciones en el suelo del viñedo: si la medida se efectúa en agua los datos observados corresponden a una situación de hidratación del suelo por factores climáticos (lluvia) o por el riego; en el caso de utilizar KCl determinamos el potencial ácido del suelo si se utilizaran abonos inorgánicos (KNO<sub>3</sub>) sustituyéndose el ión H<sup>+</sup> por K<sup>+</sup> liberándose al medio; y la medida con CaCl<sub>2</sub> simula la sustitución de iones divalentes Ca<sup>2+</sup>. La diferencia entre la medida en agua y KCl permite determinar el potencial ácido de un suelo, cuanto mayor es la diferencia es también mayor la acidez potencial del suelo en caso de tratarlo con abonos inorgánicos. De forma similar, la medida del pH en CaCl<sub>2</sub> es interesante de analizar si el suelo presenta material cálcico como dolomías debido a que el ión Ca<sup>2+</sup> estaría unido a partículas coloidales como las arcillas o partículas de humus y, por tanto, la variación entre la medida en agua y en CaCl<sub>2</sub> sería mínima.

### 4.3.3. Caracterización mineralógica del suelo. Difracción de rayos X.

En esta sección se detalla la metodología utilizada para la caracterización mineralógica del suelo mediante difracción de rayos X, cuyo fundamento teórico

se ha descrito con anterioridad en la *Sección 1.1.3* “Composición mineralógica del suelo” de la *INTRODUCCIÓN*.

Dentro de los métodos de difracción se elige el método del polvo debido a que el objetivo es lograr la identificación de los diferentes minerales que constituyen un suelo. Al no precisar la resolución o refinamiento de estructuras cristalinas, se descartan los métodos basados en monocristal. La difracción se basa en la interacción onda-materia, en la que esta última responderá según sus características estructurales. Este material se irradia con un haz monocromático, e indudablemente siempre habrá planos cristales en la posición adecuada para reflejar los rayos X al satisfacer la ley de Bragg (Bragg & Bragg, 1913; Bragg, 1913), que determina cuando la interferencia es constructiva o destructiva en función del ángulo de incidencia (Figura 4.3) y permite determinar la naturaleza cristalina del material. De este modo, observando la respuesta y conociendo el fenómeno al que responde, es posible deducir información sobre el material objeto de estudio: el suelo vitícola.



**Figura 4.3:** El ángulo de desviación  $2\theta$  determina que el cambio de fase del haz difractado constituya una interferencia constructiva (izq.) o destructiva (drcha.).

Para determinar la composición cristalina se utilizaron las muestras de suelo secadas y tamizadas con un tamaño de grano  $<2$  mm, este procedimiento se ha detallado en la sección 4.2 “*Tratamiento y conservación de las muestras de suelo*”. En primer lugar, se pulverizó una porción representativa de la muestra total, aproximadamente dos gramos, con un mortero de ágata. El uso de ágata evita contaminaciones que se podrían producir debido al uso de un material metálico. Para asegurar estadísticamente que todas las familias de planos cristalinicos de todas las fases presentes estén orientadas en las posibles direcciones del espacio, se hizo pasar el polvo obtenido por un tamiz 400 ASTM, de  $52 \mu\text{m}$  de luz de paso. El método del polvo requiere de, como se ha explicado en la *Sección 1.1.3*, un polvo policristalino desorientado y una radiación monocro-

mática. Esta radiación se genera en el tubo de rayos X en la que el cátodo (W) emite electrones que impactan en el ánodo (Cu), que es el que irradia el haz de rayos X con una energía de 8,04 keV correspondiente a una  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$  ( $K\alpha$  Cu= $2\pi/(1,54 \text{ \AA})=4,07 \text{ \AA}^{-1}$ ). El polvo policristalino de suelo se depositó en un portamuestras de aluminio y se introdujo en el difractómetro Siemens D5000 con monocromador de grafito. La diferencia de potencial eléctrico se mantuvo constante a 40 kV con una intensidad de 30 mA. El intervalo de exploración, definido por el ángulo  $2\theta$  (2-theta), fue variable entre  $2^\circ$  y  $70^\circ$ , con una velocidad de exploración de  $2^\circ 2\theta/\text{min}$ . Debido a que los filosilicatos suelen presentar reflexiones comunes con el método del polvo, se prepararon “agregados orientados”. Los agregados orientados se confeccionan pipeteando unas gotas de la suspensión acuosa (preparada con cada una de las muestras pulverizadas) sobre un portamuestras de vidrio y dejándolo secar a temperatura ambiente. Así se consigue la orientación de los filosilicatos perpendicularmente a su eje c, plano (0, 0, 1) que, en los difractogramas, se traduce en un reforzamiento de las reflexiones basales. Este aumento de la resolución, unido a tratamientos específicos, permite diferenciar los filosilicatos presentes en cada muestra. Para los agregados orientados (AO) se mantuvieron las condiciones de rodaje en el difractómetro pero el intervalo de exploración fue de  $2^\circ$ - $20^\circ 2\theta$ .

Respecto a los tratamientos específicos, se utilizó la solvatación con etilenglicol en atmósfera saturada durante 48h a  $60^\circ \text{C}$  (AO+EG) para detectar los filosilicatos hinchables (esmeclitas, interestratificados con esmeclita, clorita hinchable) (Romero, 1988) y el tratamiento térmico (AO+ $550^\circ \text{C}$ ) para detectar la presencia de filosilicatos cuya estructura colapsa a  $10 \text{ \AA}$  cuando se someten, durante 2 h, a  $550^\circ \text{C}$  (vermiculita, esmeclita, paligorskita y sepiolita). La caolinita no colapsa a  $10 \text{ \AA}$ , sino que la señal desaparece (Romero, 1988). Este tratamiento permite detectar la presencia de minerales que contienen agua en la estructura y, por tanto, son susceptibles de colapsar al perderla a altas temperaturas. El colapso de la estructura se refleja en un descenso del espaciado interlaminar (Gallego *et al.*, 1969). Para la solvatación con etilenglicol, se introducen los agregados orientados en una placa Petri en cuyo interior se ha colocado un recipiente lleno del citado reactivo. La placa se mantiene cerrada en una estufa a  $60^\circ \text{C}$  durante 48 horas; de esta forma se asegura la penetración del fluido entre las láminas de los filosilicatos con capacidad de hinchamiento (esmeclitas).

La caracterización de la mineralogía total se realizó mediante comparación de cada uno de los difractogramas de polvo con las fichas del *Index X-ray Data for Minerals of ASTM International* y el programa EVA plus. La presencia de picos anchos en la posición  $4,46 \pm 0,20 \text{ \AA}$  es indicativa de existencia de

filosilicatos, que serán identificados a partir de los tres difractogramas de agregados orientados correspondientes. Las reflexiones que presentan los diferentes filosilicatos se muestran en la Tabla 4.2 según los tratamientos aplicados que corresponden con una clase de filosilicatos concreta.

**Tabla 4.2:** Índices de reflexión para normalizar el poder reflectante de los filosilicatos. El índice de reflexión varía dependiendo del tratamiento aplicado. Sin tratamiento (AO), condensación con etilenglicol (AO+EG) y tratamiento térmico (AO+550 °C). Los datos se expresan en Å (Armstrong) . Modificado de Romero (1988).

MINERAL	AO	AO+EG	AO+550 °C
Esmectita	12-15	17	10
Clorita	14	14	14
Clorita hinchable	14	18	14
Sepiolita	12	12	10
Paligorskita	10,5	10,5	–
Illita	10	10	10
Talco	9,3	9,3	9,3
Caolinita	7	7	–

Para la estimación cuantitativa se utilizó el poder reflectante de cada mineral. Las intensidades se calculan midiendo el área de las señales de las reflexiones características para cada mineral. El área calculada para cada uno de los minerales presentes en el difractograma se divide por el poder reflectante y se normaliza a 1 la suma de los cocientes así obtenidos en el difractograma.

El error cometido en la técnica DRX-método del polvo se encuentra próximo al 5 %, por lo que todos los datos son aproximativos, aunque esta técnica nos ofrece una estimación semicuantitativa suficiente para caracterizar mineralógicamente un suelo agrícola. El error máximo de esta técnica se está estudiando en la actualidad (E. Romero, comunicación personal, 12 de noviembre de 2014). Un diagrama de difracción de polvo muestra la localización de las “reflexiones” de los rayos X por el cristal, con respecto a una escala angular ( $2\theta$ ) así como las intensidades relativas de estas reflexiones según una escala vertical. La medida angular se relaciona con el correspondiente espaciado interplanar del mineral permitiendo su identificación (Figura 4.3). Con la lista de todos los espaciados y sus correspondientes intensidades, el difractograma puede identificarse usando el Fichero de Difracción de Polvo (*Powder Diffraction File*<sup>TM</sup> PDF<sup>®</sup> del ICDD<sup>®</sup>, Fawcett *et al.* (2017)) publicado por el Comité de Standars de Difracción de Polvo (*Joint Committe for Powder Diffraction Standars*, JCPDS).

Esta organización publica manuales de búsqueda como el Hanawalt Index. La interfaz de comunicación con el difractómetro y la recogida de datos se realizó mediante el *software* DIFFRAC PLUS (Rivera, 2006) y se cotejaron con la base de datos del programa EVA v.9 de SIEMENS.

## 4.4. Estimación de los parámetros microbiológicos del suelo

El suelo se define como un material complejo en el cual se suceden procesos físicos y químicos que afectan a su estructura. Si bien estos procesos afectan a cualquier material, la complejidad del suelo aumenta sobremanera por la influencia de la fracción biótica. Dentro de la parte viva del suelo se incluyen los microorganismos, siendo las bacterias las principales responsables de la actividad metabólica de un determinado suelo. Generalmente la concentración de bacterias en cada gramo de suelo oscila entre  $10^6$ - $10^9$  UFC/g SS (Unidades Formadoras de Colonia/g Suelo Seco). Los procesos metabólicos, mediados por la microbiota edáfica, también modulan los parámetros físicos y químicos, siendo un nicho amortiguado del cual depende la fertilidad de los suelos agrícolas.

### 4.4.1. Recuento de microorganismos viables del suelo

Las técnicas microbiológicas clásicas implican la manipulación y el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo y temperatura adecuadas para el tipo de microorganismo en cuestión. Con el fin de rentabilizar los recursos materiales y temporales se ha optado por el recuento de microorganismos viables en medios de cultivo sólido en combinación con una herramienta estadística binomial, como se detalla a continuación.

#### **Estimación del número de microorganismos viables mediante la técnica del NMP**

La estimación del número de microorganismos viables presentes en el suelo se ha realizado mediante el método del Número Más Probable (NMP) descrito por Woomer (1994). El diseño de este análisis se basa en un proceso estocástico discreto denominado “Ceros de Poisson o Ley de los sucesos raros”. Para determinar la cantidad de microorganismos viables por gramo de suelo seco se realizaron diluciones decimales de cada muestra de suelo en suero salino (SS) estéril 0,9 % (p/v). Para asegurar la representatividad de todos los microorganismos presentes en las muestras de suelo se partió de una dilución inicial de 10,00 g de suelo en 90 ml de SS estéril en un matraz de 250 ml. Se aseguró la

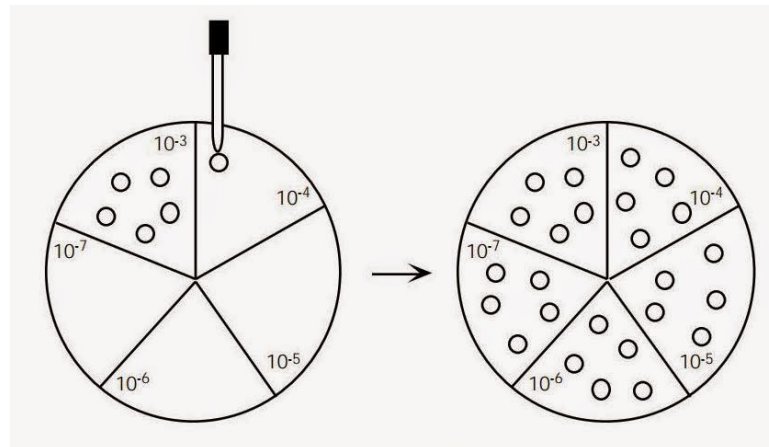
homogeneidad con un agitador orbital a 120 rpm,  $(28,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.

Se emplearon placas de Petri con diferentes medios de cultivo, atendiendo a las características metabólicas de los microorganismos implicados en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, fósforo, potasio y carbono. Las placas de Petri se rotularon definiendo 5 sectores, cada sector corresponde a una dilución decimal y consecutiva de la muestra original. En cada sector se depositaron cinco alícuotas de  $5 \mu\text{l}$  de su correspondiente dilución. Posteriormente, las placas de Petri se incubaron a  $32,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  de 24 a 48 h en medios de cultivo para bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras. En el caso de microorganismos movilizados fósforo, bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de potasio, el tiempo de incubación se extendió hasta llegar a las 4 semanas. Las lecturas se realizan de forma macroscópica visualizando únicamente si la alícuota depositada presenta crecimiento microbiano (Figura 4.4).

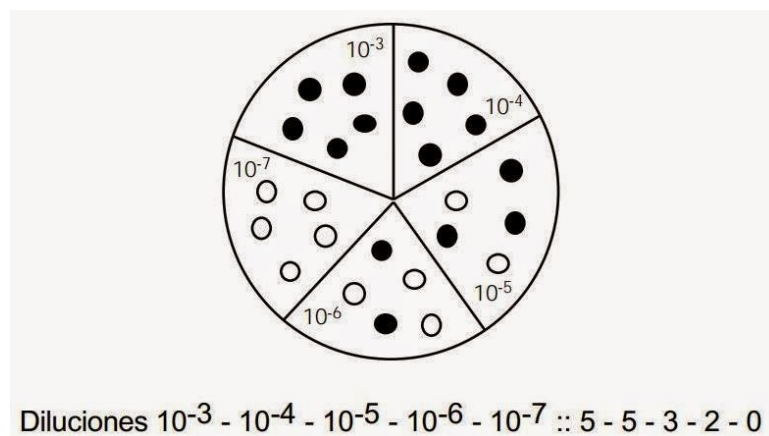
### Medios de cultivo generales

Los medios de cultivo generales se emplearon para hacer recuentos de los principales grupos microbianos (bacterias, hongos filamentosos y levaduras) en medio de cultivo sólido. Los medios de cultivos empleados fueron los siguientes:

- **PDA** (*Potato Dextrose Agar*; Agar Patata Dextrosa). Es un medio de cultivo empleado para el crecimiento de hongos filamentosos y algunos grupos de levaduras. Se caracteriza por tener la siguiente composición: 2,00 % dextrosa, 0,65 % infusión de patata, 1,50 % agar bacteriológico europeo (Condalab). Este medio de cultivo tras la esterilización ( $121^{\circ}\text{C}$ ; 1atm) debe tener un pH de  $5,6 \pm 0,2$  (a  $25^{\circ}\text{C}$ ).
- **TSA** (*Tryptone Soya Agar*; Agar Triptona de Soja). Se trata de un medio de cultivo general que permite el crecimiento de bacterias heterótrofas con composición porcentual: 1,50 % peptona de caseína, 0,50 % peptona de soja, 0,50 % NaCl (Merck, CAS 7647-14-5), 1,50 % agar bacteriológico europeo (Condalab). Es aconsejable comprobar que el pH final es  $7,3 \pm 0,2$  (a  $25^{\circ}\text{C}$ ) después de la esterilización ( $121^{\circ}\text{C}$ ; 1atm).
- **YMA-RB-CHL** (*Yeast Morphology Agar*; Agar Morfológico para Levaduras - Rosa de Bengala - Cloranfenicol): Es un medio de cultivo para el crecimiento de levaduras. Al tratarse de un medio general, puede permitir el crecimiento de hongos filamentosos y bacterias presentes en las muestras de suelo. Por esta razón al medio YMA se le incorpora rosa de



(a) Inoculación



(b) Lectura

**Figura 4.4:** Diseño de los sectores en la placa Petri con las diferentes diluciones. **(a):** En cada sector se depositan 5 alicuotas y se incuba, dependiendo del microorganismo con el que trabajemos. **(b):** Transcurrido el tiempo de incubación se efectúa la lectura. A cada punto de inoculación se le asigna el valor “1” si hay crecimiento y “0” en caso negativo. El valor de cada sector es el resultado del sumatorio de los positivos.

bengala, que ralentiza el crecimiento de los hongos filamentosos y cloranfenicol, que inhibe la microbiota bacteriana acompañante. Los componentes que definen este medio de cultivo son: 1,0 % de glucosa, 0,5 % proteosa peptona no. 4 (BD, Bacto<sup>TM</sup>), 0,3 % extracto de levadura (Condalab), 0,3 % extracto de malta, 0,005 % de rosa de bengala y 1,50 % de agar bacteriológico europeo (Condalab). Una vez esterilizado a 121 °C y 1 atm de presión se añade 0,005 % de cloranfenicol (Merck, CAS 56-75-7) al medio previamente atemperado a 70 °C.

#### Medios de cultivo específicos para el crecimiento y recuento de microorganismos en suelos agrícolas

En las explotaciones agrícolas se prioriza el análisis de los microorganismos que enriquecen el suelo y mantienen unos niveles de fertilidad óptimos para el cultivo. Para poder determinar estos grupos microbianos, en este estudio se utilizaron medios de cultivo adecuados a las necesidades nutricionales de los microorganismos implicados en la mineralización de nutrientes.

- **Agar gelatina.** Este medio de cultivo es usado para la detección de bacterias heterótrofas con actividad gelatinasa (proteolíticas). Tiene como base un medio de cultivo TSA suplementado con gelatina a una concentración del 1,00 %. El medio se esteriliza a 121 °C y 1 atm de presión. Posteriormente a la inoculación y una vez crecidas las bacterias en este medio (mantenidas a 32 °C durante 24 h) se debe revelar para determinar las colonias con actividad proteasa positiva. Para ello se utiliza reactivo de Frazier (15 % HgCl<sub>2</sub> (aq.) p/v, 7 % v/v HCl (aq.)) que se adiciona a la superficie del medio y se observa la presencia de halo para determinar si la colonia observada es positiva (con halo) o negativa (sin halo) para la degradación de la gelatina.
- **Agar almidón.** Para determinar la actividad amilasa de las bacterias heterótrofas del suelo se ha utilizado una base de TSA suplementado, esta vez y a diferencia del anterior, con 1,00 % de almidón soluble. La esterilización se realiza a 121 °C y 1 atm de presión. Una vez inoculado y transcurridas 24 h de incubación a 32 °C se reveló. La actividad amilásica de las colonias crecidas mediante la adición de lugol (2,00 % I<sub>2</sub> (aq.), 1,00 % KI (aq.) p/v) sobre toda la superficie de la placa para detectar las colonias con halo transparente, es decir con actividad amilásica positiva.
- **Agar Aleksandrov.** Se trata de un medio de cultivo diferencial para detección de bacterias solubilizadores de potasio (*Potassium-solubilizing Bacteria*, KSB) se ha preparado siguiendo las indicaciones del trabajo

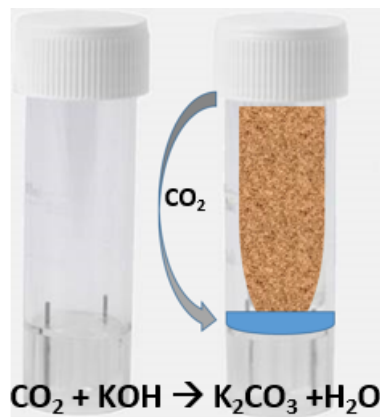
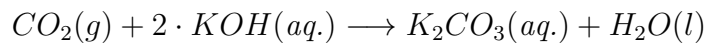
de Aleksandrov *et al.* (1967). En nuestro caso se ha sustituido la adición de apatito por ortosa (plagioclasa potásica) y, para diferenciar visualmente este medio del medio Pikovskaya, también se ha sustituido el indicador de pH verde de bromocresol por púrpura de bromocresol : 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 %  $\text{CaCO}_3$ , 0,30 % feldespato potásico / silicato aluminio-potásico (ortosa), 1,30 % glucosa, 0,0006 % de  $\text{FeCl}_3$ , 0,20 %  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0,0022 % de púrpura de bromocresol, 1,50 % agar bacteriológico europeo (Condalab). Verificando un pH final a 25 °C de  $7,2 \pm 0,2$  posterior a la esterilización a 121 °C y 1 atm de presión.

- **Agar Pikovskaya.** Se trata de un medio de cultivo sólido que permite estimar la concentración de microorganismos solubilizadores de fósforo Pikovskaya (1948) modificado por Gupta *et al.* (1994) con la adición del indicador de pH azul de bromofenol. Este medio se ha preparado en dos fases para evitar la precipitación de las sales que lo componen:
  - 1.- Solución A: 1,30 % de glucosa, 0,05 % de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 0,02 % de NaCl, 0,01 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 % KCl, 0,05 % extracto de levadura, trazas de  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0125 % azul de bromofenol, 1,50 % agar bacteriológico europeo (Condalab). Esta solución debe tener un volumen de 9/10 del volumen total a preparar.
  - 2.- Solución B: 0,25 %  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Esta solución debe tener un volumen de 1/10 del volumen total del medio.Una vez homogeneizadas las soluciones se esterilizan (121°C;1 atm) y mezclan en condiciones asépticas para obtener el medio de cultivo final.
- **Agar Ashby.** Las bacterias PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) son capaces de fijar  $\text{N}_2$  atmosférico debido a que llevan la información genética que codifica la enzima denominada nitrogenasa. Por este motivo, el medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno requiere de sales libres de N y una fuente de carbono fácilmente asimilable, como se detalla a continuación: 2,00 % glucosa, 0,02 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,02 %  $\text{MgSO}_4$ , 0,02 % NaCl, 0,01 %  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,50 %  $\text{CaCO}_3$ , 1,50 % agar. Este medio de cultivo se esteriliza a 121°C y 1 atm de presión. Es necesario verificar que el pH final de este medio de cultivo sólido es  $7,4 \pm 0,2$  (a 25 °C).

#### 4.4.2. Respiración Inducida por Sustrato

Como ya se mencionó en la *Introducción*, la respiración del suelo es un proceso que implica la liberación del  $\text{CO}_2$  producido por el metabolismo aerobio de los microorganismos del suelo.

Esta técnica se basa en la adición de glucosa como sustrato respirable y talco como aditivo anti-aglomerante, en una muestra previamente humedecida de suelo. La respiración inducida por sustrato está altamente influenciada por el contenido de agua en el suelo (Wardle & Parkinson, 1990). Una porción de suelo de 30 g se humedeció hasta el 60 % de capacidad y se incubó durante 3 días a 22 °C en frascos de vidrio estériles. Finalizada la incubación, se añadieron glucosa (5 mg/g de suelo) y talco (25 mg/g de suelo) a 15 g de suelo. El material restante se analizó para determinar la humedad del suelo mediante técnica gravimétrica ISO 11465:1993. En cada vial para muestra (SY-LAB, Neupurkersdorf, Austria) se depositaron 5 g de suelo con glucosa y talco y se sellaron. Se analizaron, por triplicado, cada una de las muestras de 5 g de suelo por cada parcela. En el vial contenedor, provisto de electrodos, se depositaron 2 ml de KOH (0,2 %) en contacto con los bornes (Figura 4.5) para determinar el CO<sub>2</sub> fijado mediante la siguiente reacción:



**Figura 4.5:** Viales para efectuar la medida de la actividad respiratoria por variaciones de pH. El CO<sub>2</sub> producido por efecto de la respiración microbiana se fija en la solución de KOH ubicada en la parte inferior del vial. Este suceso se traduce en un cambio de la impedancia eléctrica que se interpreta con el equipo  $\mu$ -Trac 4200, SYLAB.

El ión CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> aumenta la conductividad eléctrica y mediante el equipo MicroTrac (Figura 4.6), se adquirieron los datos y se interpretaron en mg de CO<sub>2</sub> desprendidos por kg de suelo seco (mg CO<sub>2</sub>/kg SS).



**Figura 4.6:** Equipo de medida de la actividad respiratoria por variaciones de la impedancia ( $\mu$ -Trac 4200, SY-LAB, Neupurkersdorf, Austria).

## 4.5. Perfiles bioquímicos

La productividad del suelo está determinada por la acción de distintos parámetros. De todos ellos, es la biomasa microbiana es la que controla gran parte de los procesos que implican la transformación y ciclos de nutrientes, el mantenimiento de la materia orgánica lábil, así como la macro-agregación que favorece la retención de agua y la aireación del suelo. A nivel bioquímico, los parámetros que aportan información más sensible a cualquier cambio son las actividades enzimáticas, consideradas como un fiel reflejo de la potencialidad del suelo a realizar procesos bioquímicos específicos. A continuación se indican algunas de estas actividades que aportan una gran información sobre las características y la potencial fertilidad del suelo de los viñedos.

### 4.5.1. Actividad Fosfatasa alcalina [EC 3.1.4.1]

El fósforo es un nutriente fundamental para el desarrollo de las plantas y en suelos cultivables es un factor limitante de la productividad vegetal. Las enzimas encargadas de la hidrólisis de los compuestos de fósforo orgánico reciben el nombre general de fosfatasas y son responsables de la hidrólisis de los enlaces en los ésteres fosfóricos (C-O-P), anhídridos fosfóricos (P-O-P) y fosfonatos (C-P). Las más estudiadas son las fosfomonoesterasas que se clasifican en ácidas y alcalinas de acuerdo al pH óptimo para su actividad catalítica, las ácidas son producidas por microorganismos y las raíces de las plantas, mientras que

las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos. Debido a las características de los suelos estudiados (pHs alcalinos), el análisis de la fosfomonoesterasas ácidas carece de interés y los análisis efectuados se han centrado en las fosfomonoesterasas alcalinas. La medida de la actividad fosfatasa alcalina se realizó siguiendo la normativa ISO 20130:2018 *Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates*. Para su estimación se utilizó p-nitrofenil fosfato disódico hexahidratado (Merck; CAS 4264-83-9) como sustrato cromogénico para cuantificar la reacción. Previamente al análisis se realiza la recta de calibrado de p-nitrofenol (Figura [Figura D.29](#)), procedimiento descrito detalladamente en la citada norma ISO 20130:2018. En una placa multipocillo se depositaron 125  $\mu\text{l}$  de suspensión de suelo (4 g: 25 ml) y 25  $\mu\text{l}$  de sustrato (0,05M). Se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de sustrato a los pocillos control y 125  $\mu\text{l}$  de agua destilada para establecer el blanco. Tras una incubación de 0,5 h a  $37\pm 0,5$  °C se detuvo la reacción con 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 100  $\mu\text{l}$  de Trizma<sup>®</sup> 100 mM pH=12 (MERCK). Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 2.500 rpm para sedimentar el suelo. Se transfirieron 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a una placa multipocillo, efectuando la lectura de absorbancia a 405 nm con el espectrómetro VARIOSKAN LUX (Thermo SCIENTIFIC).

#### 4.5.2. Actividad $\beta$ -galactosidasa [EC 3.2.1.22]

La enzima  $\beta$ -galactosidasa pertenece al grupo de las glicosidasas, que son sintetizadas por los microorganismos del suelo que intervienen en el ciclo bioquímico del carbono, catalizando la liberación de azúcares de bajo peso molecular. La enzima  $\beta$ -galactosidasa es una enzima poco estudiada, pero muy importante en la descomposición catalítica de las enmiendas orgánicas, como método para valorar el efecto de estas prácticas sobre la calidad del suelo.

La medida de la inhibición de esta actividad es un ensayo rápido y eficaz para determinar la toxicidad de distintos compuestos xenobióticos sobre los microorganismos del suelo ([García Izquierdo, 2003](#)). Así, la actividad  $\beta$ -galactosidasa en suelos enmendados con residuos urbanos puede establecerse como un parámetro para el seguimiento y control del efecto contaminante sobre la microbiota edáfica y, en general, sobre el medio edáfico. La medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó siguiendo la norma ISO 20130:2018 *Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates*. Se utilizó p-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (Merck; CAS 3150-24-1) como sustrato cromogénico para cuantificar la reacción enzimática. Previamente al análisis se realiza la recta de calibrado de p-nitrofenol (Figura [Figura D.29](#)), procedimiento descrito detalladamente en la citada norma ISO 20130:2018. En una placa multipocillo se depositaron 125  $\mu\text{l}$  de suspensión de

suelo (4g : 25ml) y 25  $\mu$ l de sustrato (0,02 M). Se añadieron 25  $\mu$ l de sustrato y 125  $\mu$ l de agua destilada los pocillos control como blanco de la reacción. Tras incubación de 3 h a  $37\pm 0,5$  °C se detuvo la reacción con 25  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 100  $\mu$ l de Trizma 100 mM pH=12 (Merck). Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 2.500 rpm para sedimentar el suelo. Se transfirieron 200  $\mu$ l del sobrenadante a una placa multipocillo, en la cual se efectuó la lectura de absorbancia a 405 nm con el espectrómetro VARIOSKAN LUX (Thermo SCIENTIFIC).

### 4.5.3. Actividad deshidrogenasa [EC 1.1.x.y]

La actividad deshidrogenasa está ligada a la oxidación molecular de sustratos a través de la cadena de transporte de electrones. Así la actividad deshidrogenasa total depende de las distintas actividades deshidrogenasas parciales de todos los microorganismos del suelo. Tiene un papel fundamental en las etapas iniciales de la oxidación de la materia orgánica, por tanto es un indicador del sistema red-ox microbiano, por lo que suele considerarse un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo y un indicador general de la actividad microbiana del mismo. Dentro del grupo de las reductasas o deshidrogenasas existen diferentes tipos. Por este motivo se citan mediante la siguiente expresión EC 1.1.x.y, las letras “x” e “y” definen cualquier número entero y su posible combinación. Por ejemplo, una deshidrogenasa EC 1.1.1.1 se identifica con una proteína en dedo de zinc que permite una actividad alcohol deshidrogenasa y que tiene como aceptor final de electrones el  $\text{NAD}^+$ . En la norma ISO 20130:2018 no se describió un procedimiento de medida la actividad deshidrogenasa en suelo. Por este motivo, se diseñó un protocolo de medida en placas multipocillo para evaluar esta actividad. Para cuantificar el número de células metabólicamente activas se utilizó alamarBlue<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>), reactivo basado en resazurina. Se depositaron 4,00 g de suelo en 25 ml de Tris-HCl (pH=7,5 0,5M) y se incubó en agitación orbital a 120 r.p.m. durante 30 min. Posteriormente se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l de suspensión de suelo y se añadieron 20  $\mu$ l de alamarBlue<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) en cada pocillo de la placa multipocillo de polietileno negro. La placa se incubó a  $37\pm 0,5$  °C durante 20 h. Finalizada la incubación, se añadieron a los pocillos control 20  $\mu$ l de alamarBlue<sup>®</sup>. Posteriormente se paró la reacción con SDS 3% en PBS (pH=7,4). Se efectuó la lectura de emisión de fluorescencia a 585 nm ( $\lambda_{ex} = 570\text{nm}$ ) con el equipo VARIOSKAN LUX (Thermo SCIENTIFIC).

### 4.5.4. Actividad proteasa [EC 3.4.21.122]

Para cuantificar la actividad enzimática proteasa se siguió el siguiente procedimiento modificado de Smeltzer *et al.* (1992), ajustando los volúmenes para

la puesta a punto del método de medida colorimétrica en suelo para placas multipocillo. Se depositaron 4,00 g de suelo en 25 ml de Tris-HCl (pH=7,5 0,5M) y se incubó en agitación orbital a 120 r.p.m. durante 30 min. Posteriormente se tomaron alícuotas de 125  $\mu$ l de suspensión de suelo y se añadieron 25  $\mu$ l de azocaseína (2% p/v) en cada pocillo de la placa multipocillo. La placa se incubó a  $40\pm 0,5$  °C durante 24 h. Finalizada la incubación, se añadieron a los pocillos control 20  $\mu$ l de azocaseína (2% p/v). Posteriormente se paró la reacción con 125  $\mu$ l TCA (ácido tri-cloro-acético, 10% p/v). Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 2.500 rpm para sedimentar el suelo. Se transfirieron 100  $\mu$ l del sobrenadante a una placa multipocillo y se neutralizó añadiendo 100  $\mu$ l de NaOH (1 M). Finalmente, se efectuó la lectura de absorbancia a 440 nm con el espectrómetro VARIOSKAN LUX (Thermo SCIENTIFIC).

## 4.6. Caracterización mediante técnicas moleculares de las poblaciones microbianas presentes en suelo

El estudio de la diversidad genética de la población microbiana presente en el suelo permite complementar las técnicas anteriores. Las cuales están basadas en el crecimiento microbiano o en la actividad enzimáticas producidas por las enzimas de bacterias presentes en el suelo. En las siguientes secciones se detalla cómo se procesan las muestras de suelo para la extracción de ADN y la resolución de esta información genética en resultados tangibles.

### 4.6.1. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante

La técnica que vamos a exponer a continuación se realiza en varias etapas. En primer lugar, es necesario extraer el ADN total contenido en el suelo, el cual corresponde a la totalidad de los organismos que habitan en él. Posteriormente es necesario la amplificación del ADN y, en este paso, sólo se amplifica el material genético bacteriano aumentando las copias de la región deseada. Por último los productos de amplificación se resuelven en un gel con gradiente desnaturalizante para la obtención de los datos poblacionales.

#### Extracción de ADN

Se tomaron alícuotas de 4,00 g de suelo y se incubaron en tampón fosfato (50 Mm, pH = 6,80) durante 48h a 28 °C y con una agitación orbital de 120 rpm.

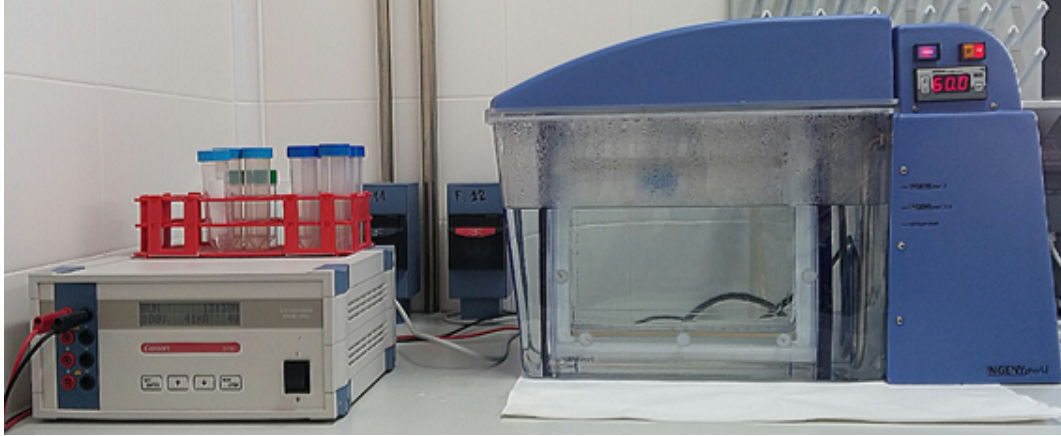
El sedimento se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm. Previa eliminación del sobrenadante, el ADN total de cada una de las muestras de suelo de las doce parcelas se extrajo siguiendo el protocolo del Kit Mo Bio PowerSoil® DNA Isolation, Mo Bio Laboratories Inc. (Carlsbad, CA, USA).

### **Amplificación génica**

En el suelo la mayor parte de microorganismos se corresponden al Dominio *Bacteria* y, por tanto, el perfil bacteriano de un suelo agrícola es un parámetro representativo para el estudio de la biodiversidad edáfica. El análisis polimórfico bacteriano o *fingerprinting* se llevó a cabo mediante la amplificación génica de la región V3-V5 del ADNr 16S. Para la amplificación se usó DreamTaq Green Master Mix (Thermo Scientific), que incluye la Taq polimerasa, dNTPs, el tampón  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{MgCl}_2$  y el tampón de carga para la resolución de los productos de PCR por técnicas electroforéticas. Para evitar el efecto quelante de las trazas de ácidos húmicos y fúlvicos que pudieran contener la muestras y que inhiben la actividad polimerasa, se suplementó la reacción con BSA (0,03 mg/ml) y  $\text{MgCl}_2$  (3 mM). Los oligonucleótidos que permitieron la amplificación de dicho fragmento son 341F-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') y 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'), siguiendo el programa de PCR siguiente: 95 °C durante 5' para desnaturalización inicial; 30 ciclos: 95 °C, 1' / 58 °C, 1' / 72 °C, 2'; 72 °C, 10' de polimerización final; conservación a 4 °C hasta la recogida de los amplificados. Los productos de PCR fueron conservados a una temperatura de -80 °C hasta su resolución electroforética.

### **Preparación del gel en gradiente desnaturalizante de poliacrilamida**

La resolución de los productos de PCR se realizó en gel de poli-acrilamida al 6% p/v (40% acrilamida; 37,5:1) en gradiente desnaturalizante. El gradiente de urea/formamida se preparó mediante el empleo de un generador de gradientes, en el cual se depositan 25 ml de las soluciones stock 70% y 30% de urea/formamida y se polimeriza con 100  $\mu\text{l}$  de per-sulfato amónico ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ; 10% p/v) y 18,8  $\mu\text{l}$  de TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletildiamina; Sigma-Aldrich). La cubeta del equipo INGENY phorU System debe contener TAE 1 $\times$  a 60 °C en el momento de introducir el gel. Se cargaron 25  $\mu\text{l}$  de los productos de PCR en cada pocillo. El gel se sometió a una diferencia de potencial de 100 V y con intensidad de 35-40 mA durante 14-16 h. Posteriormente se incubó el gel en 500 ml de TAE (Tris Acetato-EDTA) 1 $\times$  con 50  $\mu\text{l}$  de SYBR® GOLD (Invitrogen™) durante 60 minutos. La captura de imagen del gel se realizó con el equipo de documentación de geles SYNGENE Gen-i.



**Figura 4.7:** Cubeta de electroforesis INGENY phorU *System* para la resolución de los productos de PCR mediante gel de poliacrilamida en gradiente desnaturalizante.

El índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) permite conocer la biodiversidad de un determinado nicho ecológico ((Shannon, 1948). Mediante las siguiente expresión se calcula este índice:

$$H' = - \sum (P_i \cdot \ln P_i)$$

donde:  $P_i = \frac{I_b}{I_c}$ ,

siendo:

$H'$ : El valor del cálculo de la biodiversidad, expresada en bits,

$I_b$ : La intensidad de los píxeles de una banda concreta,

$I_c$ : El sumatorio de la intensidad de cada carril.

En este caso aplicaremos el índice  $H'$  para definir la biodiversidad bacteriana del suelo de las diferentes parcelas estudiadas. A partir de las bandas del gel de poli-acrilamida (DGGE) se determina el número de posibles especies bacterianas, ya que cada banda se asimila a una posible especie o grupo microbiano. Al número de especies se le denomina riqueza (R). Además del número de especies también es necesario conocer el número de efectivos de una determinada especie y para ello se mide la intensidad de los píxeles de una determinada banda ( $I_b$ ). Para este proceso se ha desarrollado un *software* basado en el entorno Matlab<sup>®</sup> que permite el análisis del gel y el cálculo del índice  $H'$ .

### 4.6.2. Análisis meta-taxonómico de las muestras de suelo

Las técnicas metagenómicas permiten la obtención de un gran volumen de datos genéticos de la comunidad edáfica. En este trabajo se ha empleado una técnica basada en metagenómica denominada meta-taxonómica. Esta técnica consiste en la amplificación del material genético de las comunidades microbianas que residen en el suelo mediante PCR y el posterior análisis de los fragmentos amplificados en un secuenciador automático. La extracción de datos para el análisis meta-taxonómico de las muestras de suelo se realizó en el laboratorio de la empresa BiomeMakers (890 Embarcadero Drive, West Sacramento, CA 95605). Brevemente resumimos la línea metodológica que se siguió en el laboratorio. En primer lugar, se extrajo el ADN que contenían las células vegetativas y esporas presentes en la muestra (PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit – Mo Bio). La extracción del ADN se basa en la utilización de un tampón de extracción, con un pH=8,0 y con partículas de sílice, que actúan como matriz de lisis. Posteriormente se sometió a un proceso físico vibratorio de 5,5 m/s durante dos ciclos de 30 s con el equipo FastPrep-24<sup>™</sup> 5G. Tras la ruptura de las células se precipitó el ADN mediante la adición de las soluciones incluidas en el citado kit. Una vez purificado el ADN, y previo control de calidad con el equipo NanoDrop<sup>™</sup> 3000, se procede a la generación de una biblioteca genómica. En este punto el ADN se somete a un proceso de amplificación mediante la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se utilizan cebadores específicos para hongos filamentosos/levaduras (ITS) y para bacterias (región V4, ADNr 16S) añadiéndose un código de barras (construido con 3 o 4 bases nucleotídicas diferentes) para que, en el secuenciador, se puedan leer los fragmentos sin errores. Finalmente, el ADN amplificado y etiquetado se procesa por el equipo de secuenciación MiSeq (illumina<sup>©</sup>) y se obtienen los “datos crudos” (las secuencias genéticas sin filtrar). Una vez obtenidos los datos, todas las secuencias se depuran mediante un *software* informático y se comparan con las bases de datos genéticas públicas. De esta forma, extraemos gran cantidad de datos genéticos del suelo (secuencias específicas correspondientes a especies microbianas presentes) para poder estudiar la relación que presentan entre ellos.

## 4.7. Análisis estadístico y extracción de datos

Los análisis de componentes principales o PCA (*Principal Component Analysis*), los ajustes de regresión lineal, ANOVAs (*ANalysis Of VAriance*), MANOVAs (*Multivariate ANalysis Of VAriance*) y gráficos de cajas y bigotes fueron utilizados para extraer la información relevante de los datos obtenidos. Estos se procesaron y representaron con el *software* InfoStat 2018 (Balzarini *et al.*,

2008; Di Rienzo *et al.*, 2018), cuya licencia fue facilitada por la Dra. Cecilia Bruno (CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de Córdoba –Argentina-).

Los datos del recuento de microorganismos mediante técnicas dependientes de cultivo se ajustan a una función de densidad de probabilidad log-normal. Para el ajuste de los datos de recuento a una función de densidad normal se aplicó logaritmo a todos los datos de recuento (UFC/gSS). Mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y análisis multivariado de la varianza (MANOVA) se comprobó la significancia de los resultados entre grupos. Posteriormente se verificó mediante el ajuste de los datos en STATGRAPHICS Centurion XVIII.

Para el estudio relacional del contenido de nitrógeno del suelo y la implicación de las bacterias fijadoras de nitrógeno en este valor, se ha utilizado la plataforma web CARTO.

## 4.8. Programa de análisis DGGE

En este trabajo también se ha diseñado y programado el *software* utilizado para análisis geles de PCR-DGGE. Además de permitir el análisis robusto de imagen, esta herramienta devuelve el cálculo de índices de diversidad. En este trabajo se ha calculado el índice de Shannon a partir de los datos extraídos. El *software* consta de 7 subprogramas enlazados los cuales realizan una tarea definida y compartimentada. En primer lugar la imagen del gel DGGE se recorta con la ayuda del subprograma *laneTrimmer.m* el cual separa las calles o carriles del gel en imágenes separadas, esta tarea se realiza mediante la ayuda de un cursor que permite un recorte de bandas preciso. Seguidamente se procesan las imágenes con *intensitiesAdder.m* y *amplifier.m* generando un electrograma de intensidades de banda amplificado. Los datos de intensidad se ajustan mediante el subprograma *spectrumPeaksHunter.m* para evitar mínimos locales en el análisis de picos de intensidad. Teniendo en cuenta que la visión humana no se corresponde a un ajuste lineal sino logarítmico (Fechner, 1860), se ha ajustado de forma lineal (transformando la función mediante el logaritmo decimal) la señal de intensidad con *linearScaling.m*. Por último, los datos extraídos de intensidad de banda se analizaron calculando el índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) mediante la expresión matemática descrita con anterioridad en la Sección 4.6.1, la cual se incluye en el subprograma *SWIndex.m* finalizando con una salida gráfica de los datos procesados con *SWIndexGraph.m*. El código fuente del programa en lenguaje matlab se encuentra disponible en la siguiente dirección web: <https://github.com/c4lex1987/DGGE-bacterial-diversity-analysis.git>



## 5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MADERA DE LA VID

La madera de vid es un material altamente lignificado y requiere de técnicas adaptadas para la inhibición o bloqueo de compuestos fenólicos, aunque con ciertas similitudes con las técnicas moleculares utilizadas en el análisis del suelo. Estos compuestos cíclicos interfieren en la amplificación genética impidiendo la identificación de los hongos fitopatógenos que se pudieran encontrar en las muestras de madera estudiadas. Además de esta consideración se debe prestar especial atención a la conservación de las muestras de madera debido a la posibilidad de que hongos filamentosos ambientales proliferen en el seno de este material y subestimen el proceso de recuperación y aislamiento de hongos fitopatógenos.

### 5.1. Recogida y transporte de muestras de madera en campo

La obtención de las muestras de madera se realizó a partir de plantas adultas que presentaban signos patológicos en la explotación vitícola. La extracción de madera se realizó con un serrucho japonés *Mawashibiki*, obteniéndose fragmentos de 15 cm de longitud de madera de vid contaminada. Las muestras de madera se transportaron en bolsas de papel de estraza individuales para prevenir una posible contaminación cruzada y evitar la condensación de agua por variación de temperatura.

## 5.2. Obtención de muestras de vides jóvenes procedentes de vivero

La verificación de la ausencia de hongos filamentosos fitopatógenos presentes en plántones de vivero a la hora de plantar un terreno se realiza mediante el análisis microbiológico del material vegetal. En este trabajo el material de análisis fue cedido por Viveros Villanueva S.L. Se procesaron 15 plántones, los cuales se mantuvieron en vermiculita hidratada estéril hasta que se observó el primer brote, asegurando de esta forma un correcto funcionamiento sistémico de la planta.

## 5.3. Conservación de las muestras de Madera

Las muestras de madera adulta que presentaban una lesión avanzada se conservaron a 4 °C. A esta temperatura se minimiza el crecimiento de los hongos ambientales presentes en la superficie y, por tanto, garantiza una mejor recuperación de los hongos patógenos.

Para asegurar la estabilidad del ADN de los microorganismos presentes en la madera, las muestra obtenidas se conservaron a -80 °C. En el caso de las muestras de madera adulta únicamente se preservó la zona afectada visible macroscópicamente y para madera joven procedente de vivero se fraccionó la planta obteniéndose 3 submuestras de diferentes partes: raíz, portainjerto y vara.

## 5.4. Identificación de microorganismos patógenos viables en la madera de la Vid

Como ya se ha comentado en la introducción, los hongos filamentosos son los principales microorganismos que generan enfermedades en la madera de la vid. Es necesario definir un método de recuperación e identificación de los hongos fitopatógenos presentes en una lesión macroscópica en la madera. Esta lesión puede ser leve pero podría derivar en una patología severa en un tiempo corto. Cabe destacar que, en este escenario, los hongos podrían encontrarse viables y verificaríamos que el proceso patogénico se encuentra activo si presenta crecimiento *in vitro*. Este análisis es interesante de realizar en madera de plántones procedentes de vivero para confirmar un estado aceptable de contaminación y no tener problemas futuros en la explotación. En madera adulta este análisis ayudaría a tomar la decisión de extraer la vid de la producción para evitar una contaminación generalizada del viñedo.

### 5.4.1. Extracción y crecimiento de microorganismos fitopatógenos

En los plantones procedentes de vivero y en la madera procedente de la explotación vitícola se practicó una técnica de desinfección superficial sumergiendo la madera en una solución de hipoclorito de sodio (2 min; 40 ppm), etanol (1 min; 70% v/v) y el último lavado se realizó por triplicado con AD-DEST. Posteriormente se obtuvieron muestras con bisturí de raíz, vara, cuello e injerto. Los fragmentos así obtenidos se depositaron sobre placas de PDA-RB-CHL (*Potato Dextrose Agar-Rosa Bengala-Cloranfenicol*). Este medio de cultivo sólido, descrito en la sección de medios de cultivo en el capítulo anterior, permite un crecimiento lento de los hongos filamentosos para poder aislarlos de forma efectiva y, además, inhibe de una posible contaminación bacterianas procedentes del ambiente donde brotaron los plantones. Las placas de cultivo, provistas de los fragmentos de madera, se incubaron a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C, un mínimo de 7 días hasta observar crecimiento fúngico. Las colonias fueron seleccionadas *de visu* en función de la coloración, tamaño, aspecto y/o textura. De esta forma evitamos la duplicidad de colonias que son similares, dado que probablemente se trate del mismo género o especie.

### 5.4.2. Secuenciación del ADN de las colonias fúngicas seleccionadas

Partiendo de la colección de aislados de madera se procesan las colonias para la extracción de ADN. Esta técnica supone, en primer lugar, la ruptura de la pared fúngica mediante procedimientos físicos y electroquímicos. Las colonias se introducen en un vial con tapón de rosca provisto de una solución preparada según el procedimiento de [Cenis \(1992\)](#) modificado con la incorporación de arena silicea de un diámetro de 2 mm. Para que la rotura mediante impacto mecánico sea efectiva se utilizó el equipo FastPrep24 (MP Biomedicals<sup>TM</sup>) que imprime una velocidad de 6,0 m/s durante 30 s, en un único ciclo. Posteriormente se continuó la purificación del ADN extraído mediante el protocolo de [Querol et al. \(1992\)](#) modificando la rotura de pared celular por medios mecánicos, en lugar de rotura enzimática, como hemos detallado anteriormente.

La amplificación del ADN de la región ribosomal 26/28S se realizó empleando los cebadores universales para la identificación de hongos filamentosos y levaduras: NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') y NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'). Las reacciones de PCR mantuvieron un volumen final de 50  $\mu$ l: 25  $\mu$ l de *DreamTaq Green DNA polymerase 2x* (Thermo Fisher), 2  $\mu$ l de cada uno de los cebadores, 2  $\mu$ l de ADN y 19  $\mu$ l de

agua miliQ, con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 56 °C durante 90 segundos, amplificación a 72 °C durante 2 minutos. La amplificación final se programó en 7 minutos a 72 °C. Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Mastercycler® 5333 *Thermal Cycler* (Eppendorf®). Como paso final, los productos de PCR se purificaron empleando el kit NZYGelPure (NZYTECH) y se envió el material a la empresa MacroGen Europe donde se realizó secuenciación Sanger en el equipo ABI 3730XL.

## 5.5. Identificación rápida de hongos fitopatógenos

Para poder identificar los hongos fitopatógenos que se encuentran en la muestras de madera de vid es necesario contar con un panel de especies verificadas para determinar la sensibilidad del método. Se realizaron dos procedimientos dependientes de amplificación genética, aunque la resolución de los productos de PCR presenta sus peculiaridades, como se explica a continuación.

### 5.5.1. Microorganismos

Se han utilizado diferentes cepas de *Cadophora luteo-olivacea*: CBS 357.51, CBS 109.296 y CBS 141.41 (CBS-KNAW); R14-02, R15-02, V13-02 aisladas en la Universidad Complutense de Madrid (UCM); BT-393, BT-301, A5-334, A5-933, A5-717, A5-1177 procedentes de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM); y GIHF-240 cedida por la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Las especies de hongos filamentosos aisladas de madera de vid que se han utilizado para comprobar la sensibilidad del método son: *Cadophora viticola* (CBS 139.517 y GIHF029), *Cadophora melinii* (CBS 268.33, GIHF135, GIHF136 y GIHF137), *Cadophora malorum* (CBS 266.31), *Cadophora novi-eboraci* (CBS 101.359), *Cadophora spadiciis* (CBS 111.743), *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum*, *Diplodia seriata*, *Dactylonectria spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Actinomucor spp.*, *Alternaria alternata* y *Clonostachys rosea*. Los aislados se cultivaron en PDA a 28 °C y se mantuvieron a 4 °C para su conservación.

### 5.5.2. Extracción de ADN total

La madera de vid se secó a 65 °C y posteriormente se sometió a una criogenización rápida en nitrógeno líquido. La rotura de la muestra se consigue introduciendo en el vial en el que se encuentran las muestras esferas cerámicas de forma toroidal de 2 mm de diámetro. Manteniendo el vial congelado, se aplica un ciclo de 40 s con una velocidad de 10,0 m/s de vibración en FastPrep. La extracción del ADN de madera se basa en la utilización de un tampón de extracción (pH=8,0) con un polímero acomplejante de compuestos fenólicos, como la polivinilpirrolidona o PVP (MERCK, CAS: 9003-39-8), que se encuentran en la madera y pueden actuar en el proceso de PCR como inhibidores de la ADN polimerasa. Posteriormente se purifican los ácidos nucleicos mediante la adición de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico y se precipita con etanol 96° y NaCl. Una vez purificado el ácido nucleico, y previo control de calidad con el espectrofotómetro NanoDrop™ 3000c para determinar cantidad y las proporciones de pureza del ADN extraído (A260/A280 para proteínas y A260/230 para sales), el ADN se almacenó a -80 °C para aplicaciones futuras.

### 5.5.3. Identificación de cepas de *Cadophora luteo-olivacea* mediante técnicas moleculares

El ADN contiene toda la información necesaria para proveer al hongo en cuestión de la maquinaria bioquímica indispensable para cubrir las necesidades celulares. La identificación molecular de un determinado hongo fitopatógeno supone la selección y amplificación de una región génica única (en disposición de bases y número) lo cual permite verificar que, efectivamente, se trata de la especie o el género en cuestión. Se han diseñado cebadores específicos mediante el programa en línea Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) para la región ribosomal del 5.8S RNAr para *C. luteo-olivacea* CBS 357.51 (NCBI Accession Number: MH856899.1). La herramienta del NCBI BLAST se ha utilizado para comprobar que el diseño de los *primers* permite la detección específica de *C. luteo-olivacea*. Los cebadores generados se denominan CaLO3 (5'-CGT GGC GGG GCT ACC CTA CTT C-3') y CaLO4 (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CGA TG-3'), los cuales amplifican una región de 251 pares de bases en el ADN extraído de *C. luteo-olivacea*.

El programa de PCR optimizado para la detección de *C. luteo-olivacea* se compone de: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 25 ciclos a 95 °C durante 1 min, 65 °C durante 1 min, 72 °C durante 1,5 min y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Se realizaron dos mezclas de PCR (A y B) : (A) 12.5 µl de polimerasa DreamTaq® Green DNA 2x (Thermo-Fisher),

1  $\mu\text{l}$  de cada cebador (50  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de ADN extraído, y 9.5  $\mu\text{l}$  de agua para análisis moleculares; (B) 12.5  $\mu\text{l}$  de polimerasa DreamTaq<sup>®</sup> *Green DNA* 2x (Thermo-Fisher), 1  $\mu\text{l}$  de cada cebador (50  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de ADN extraído, 5.3  $\mu\text{l}$  de BSA (2 mg/mL), 1.2  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (20 mM) y 3  $\mu\text{l}$  de agua para análisis moleculares.

#### 5.5.4. Visualización de los amplicones obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa

La visualización de los productos de PCR, para la decisión del diagnóstico, se resolvieron en un gel de agarosa al 0,8% empleando GelRed<sup>®</sup> (Biotium) como agente intercalante (2 $\mu\text{l}$  GelRed<sup>®</sup>/ 30 ml agarosa). La electroforesis se desarrolló en tampón TAE (0,04 M tris-acetato; 0,001 M EDTA) con un voltaje constante de 80 V durante 60 min. Para verificar el tamaño del amplicón se utilizó el patrón NZYDNA Ladder VII (NZYTECH).

### 5.6. Análisis meta-taxonómico de las muestras de madera contaminadas

La comunidad microbiana que habita en la madera permite establecer correspondencias entre géneros de hongos fitopatógenos. Para el análisis meta-taxonómico de las posibles cepas presentes en las muestras se extrajeron astillas de 1 g de las muestras recogidas en campo y vivero. Posteriormente las muestras se enviaron a la empresa BiomeMakers (890 Embarcadero Drive, West Sacramento, CA 95605) para su procesado y posterior análisis meta-taxonómico. El procedimiento seguido en el laboratorio de esta empresa se ha detallado anteriormente en la sección 4.6.2.

### 5.7. Análisis estadístico y bases de datos

La identificación de los microorganismos secuenciados mediante secuenciación Sanger se ha realizado cotejando los datos obtenidos con la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para potenciar y facilitar el análisis se usó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.* (1990)).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



# 6. CARACTERIZACIÓN MINERALÓGICA, FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO

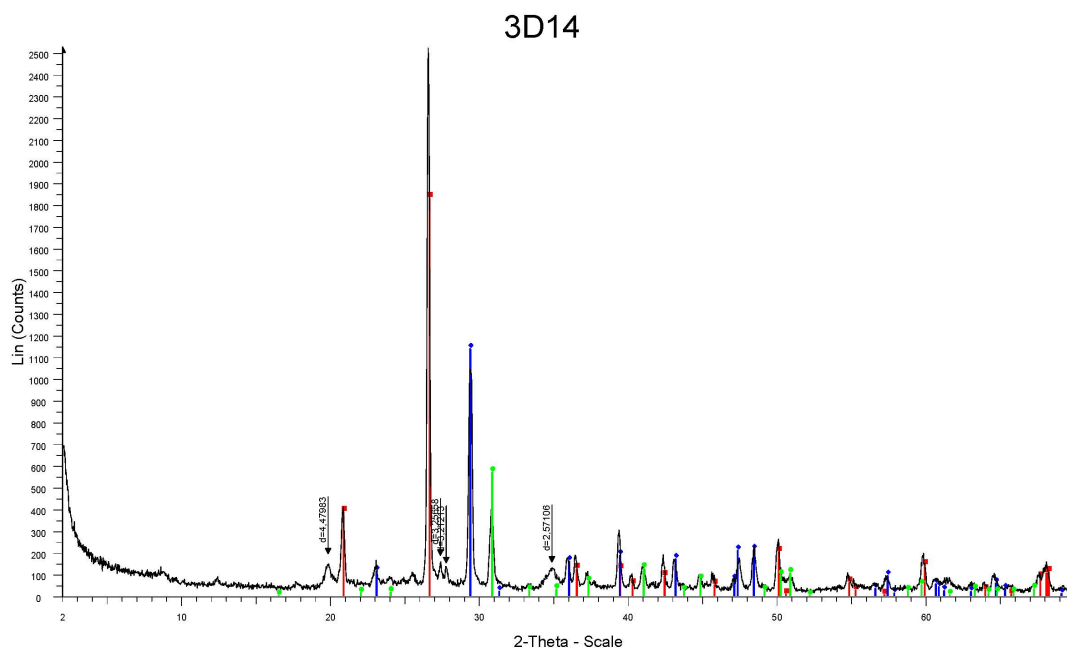
## 6.1. Resultados

En esta sección se exponen los resultados obtenidos mediante técnicas que permiten estudiar el suelo desde un punto de vista físico y químico. En primer lugar se detallan los resultados obtenidos mediante Difracción de Rayos X (DRX), los cuales definen qué minerales y en qué cantidad se encuentran presentes en el suelo. A continuación se presenta la clasificación geo-morfológica del suelo derivada de los datos obtenidos del estudio geológico realizado en trabajos asociados a este proyecto. Como complemento a los resultados obtenidos se muestran los datos relativos a la capacidad de retención de agua y variaciones de pH en el suelo, de especial importancia para la población microbiana y su actividad metabólica (véase sección 1.1).

### 6.1.1. Estimación mineralógica del suelo. Difracción de Rayos X

Para determinar la composición de un material geológico debemos conocer la estructura de los minerales que lo componen. El análisis de los diferentes minerales requiere emplear una técnica basada en la interacción onda-materia como la Difracción de Rayos X, este procedimiento se ha detallado en la *Sección 1.1.3* de la *INTRODUCCIÓN*. Los datos extraídos mediante este procedimiento se representan en un difractograma, el cual consta de dos ejes sobre los que se dibuja la intensidad de las reflexiones y el ángulo  $2\theta$ . Esta representación gráfica depende únicamente de la forma, tamaño y tipo de red y de la posición

de los átomos y naturaleza de los mismos, por lo que es evidente que cada especie cristalina presentará un difractograma típico, constituyendo, por así decirlo, una tarjeta de identidad del mineral en cuestión (Figura 6.1).



**Figura 6.1:** Difractograma los componentes mineralógicos del suelo de la parcela 3 (PDC11) en la primera recogida de muestras (Diciembre 2014). Las diferentes series cromáticas indican los patrones característicos para cada mineral. En rojo se observa el cuarzo (■), en azul la calcita (◆) y en verde dolomita (●). En abscisas se muestra el ángulo de reflexión  $2\theta$ , y en ordenadas las cuentas detectadas.

Los datos obtenidos mediante difracción no permiten un cálculo exacto de cantidad de minerales de un determinado suelo. Esto se debe a que en esta técnica no se considera ninguna magnitud escalar que permita referir los datos obtenidos. Por tanto, se pueden expresar los resultados porcentualmente pero sin estar ligados a la masa de la muestra o al volumen de esta, aunque si es posible la comparación entre muestras para diferenciar las parcelas estudiadas según los diferentes minerales que contengan.

Los datos extraídos del suelo de las parcelas analizadas mediante difracción de rayos X se muestran en la Tabla 6.1. Los resultados presentados, en la citada tabla, engloban el análisis de los minerales calcita, dolomita, plagioclasas y cuarzo. También se incluyen los datos porcentuales de filosilicatos obtenidos

a partir de la técnica de agregados orientados, como se explicó en la *Sección 4.3.3* de *MATERIAL Y MÉTODOS*. Los difractogramas de la totalidad de las muestras de suelo de las parcelas analizadas se muestran en el *Apéndice A*.

**Tabla 6.1:** Estimación porcentual de los minerales hallados en las 12 muestras de suelo estudiadas. La familia de filosilicatos comprende a la caolinita e illita, siendo sus valores relativos a la muestra.

	Mineral (%)						
	Calcita	Dolomita	Plagioclasas	Cuarzo	Filosilicatos	Caolinita	Illita
<b>PDC01</b>	11,2	38,5	0,0	7,6	42,8	0,0	0,0
<b>PDC09</b>	25,4	10,5	0,0	15,3	48,9	2,7	3,2
<b>PDC11</b>	38,9	8,5	0,0	6,8	45,8	0,6	1,4
<b>PDC12</b>	32,4	25,8	0,0	5,7	36,1	1,0	2,6
<b>PDC13</b>	19,2	20,5	0,0	11,5	48,8	0,7	1,5
<b>PSTM02</b>	17,7	20,3	0,0	14,5	47,4	1,7	8,4
<b>PSTM05</b>	20,8	19,5	0,0	9,6	50,1	3,1	2,6
<b>PSTM08</b>	13,6	42,9	0,0	4,9	38,5	0,9	2,0
<b>T03</b>	39,6	15,7	0,0	4,0	40,7	1,4	2,0
<b>V03</b>	24,9	14,4	0,9	16,4	43,4	0,8	2,8
<b>V06</b>	24,1	14,8	0,0	13,6	47,6	1,4	2,0
<b>V07</b>	33,4	9,6	0,0	9,1	47,9	0,6	0,9

Los resultados del análisis del suelo mediante difracción de Rayos X muestran diferencias entre las parcelas con un contenido en cuarzo elevado, como las parcelas V03, PDC09 y PSTM02, con porcentajes entre el 16,4% y 14,5%. Las cuales se encuentran geográficamente distanciadas entre sí, aunque en la zona opuesta a la dirección predominante del viento. Este viento atraviesa la meseta que se localiza en las zonas más altas de la finca, pudiendo transportar materiales de cuarzo, de diferente granulometría dependiendo de la velocidad del viento que se encuentra entre 12,4 km/h y 14,2 km/h (estación Peñafiel: 2166Y; AEMET).

El porcentaje de calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) es moderado-alto para un suelo agrícola (Ranjbar & Jalali, 2011), estos valores se encuentran entre el 11,2% y el 39,6%. Incluso desde la imagen satelital se pueden observar franjas blancas en el terreno pertenecientes a estas sales de calcio, como se observa en la Figura 4.1 de la *INTRODUCCIÓN*. Estos valores tan elevados condicionan las medidas de pH del suelo, el ión  $(\text{CO}_3)^{-2}$  (aq.) actúa como una base débil, aunque suficiente para elevar los valores de pH por encima de 8 (tabla de pH). En el caso de las dolomitas, el ion  $(\text{CO}_3)^{-2}$  se encuentra estabilizado por el átomo de Mg. Debido a su estructura cristalina, la solvatación de esta sal no permite la liberación de iones carbonato y, por tanto, el pH del suelo no aumenta su valor en presencia de dolomita. En general, estos suelos se pueden considerar

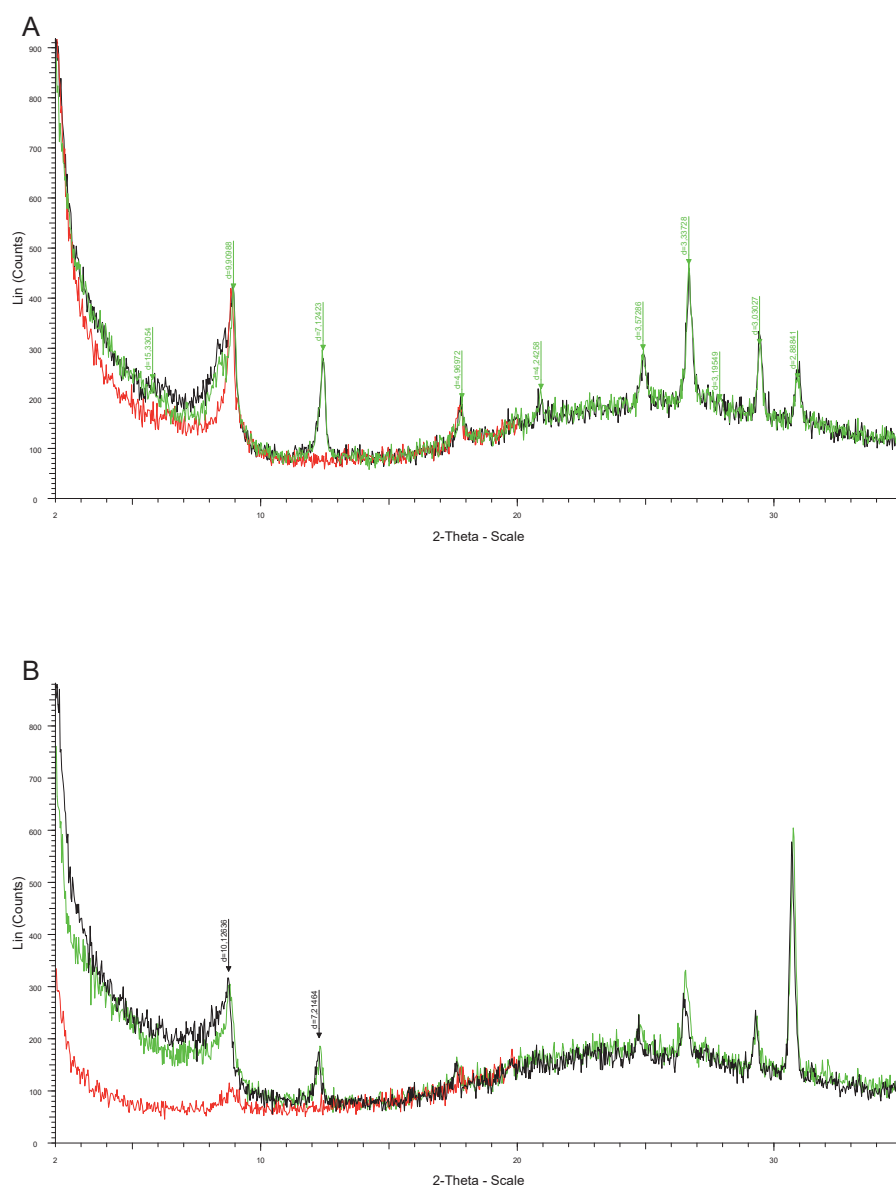
calcáreos, aunque se debe medir el porcentaje de caliza activa que proviene, esencialmente, de la calcita.

Los minerales del subgrupo de los feldespatos (*Clase*: silicatos; *Subclase*: tectosilicatos), como las plagioclasas, constituyen una serie isomórfica entre la albita  $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$  y la anortita  $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$ . Los resultados obtenidos por difracción de rayos X muestran un porcentaje muy bajo de plagioclasas únicamente en la muestra de suelo de la parcela V03, aunque no es posible definir en qué cantidad se encuentran representadas, debido a la precisión de la técnica, podemos interpretar una posible presencia de plagioclasas en la parcela V03 (*Tabla 6.1*).

Además de los minerales que se han descrito con anterioridad, se ha analizado una subclase del grupo de los silicatos denominada filosilicatos, [*phyllo*] hoja. Estos silicatos presentan propiedades físicas derivadas de su hábito laminar constituido por tetraedros con  $n$  dimensiones en un plano (X, Y, Z). Este hábito hojoso permite una exfoliación basal del mineral, siendo la rotura coplanar a los tetraedros, y no en el eje Z. Los filosilicatos detectados han sido caolinita e illita pertenecientes al grupo de las arcillas aunque no son expansivas, y por lo tanto no presentan una capacidad de hidratación elevada. La caolinita  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$  presenta un grado de hidratación similar a las illitas  $(\text{K}, \text{H}_3\text{O})(\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe})_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}[(\text{OH})_2, (\text{H}_2\text{O})]$ , formadas a partir de meteorización hídrica y térmica de moscovita y otros feldespatos (*Figura 6.2*).

### 6.1.2. Caracterización geomorfológica de las muestras analizadas

Los datos para la clasificación taxonómica de suelos de Pago de Carraovejas han sido extraídos del informe geológico asociado a los proyectos ITISOST y GLOBALVITI, gracias a los cuales hemos podido realizar este estudio geomorfológico. Las determinaciones cuantitativas de los parámetros geológicos se han analizado para establecer qué variables son más representativas de cada parcela estudiada. El conjunto de variables que definían las diferentes parcelas se componen por fracciones porcentuales de: elemento grueso, tierra fina, arena gruesa, arena fina, arena, limo, limo grueso, limo fino, arcilla, caliza total y caliza activa. También se disponen de datos porcentuales de nitrógeno y materia orgánica, de los cuales obtenemos la fracción C:N, óptima en la proporción 6:1 de forma general para microorganismos. Las variables electroquímicas que se han medido son el pH, la conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{m}$ ) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC;  $\text{mol}(+)/\text{kg}$ ). Además de estos parámetros electroquímicos se han medido iones de vital importancia como cofactores de proteínas

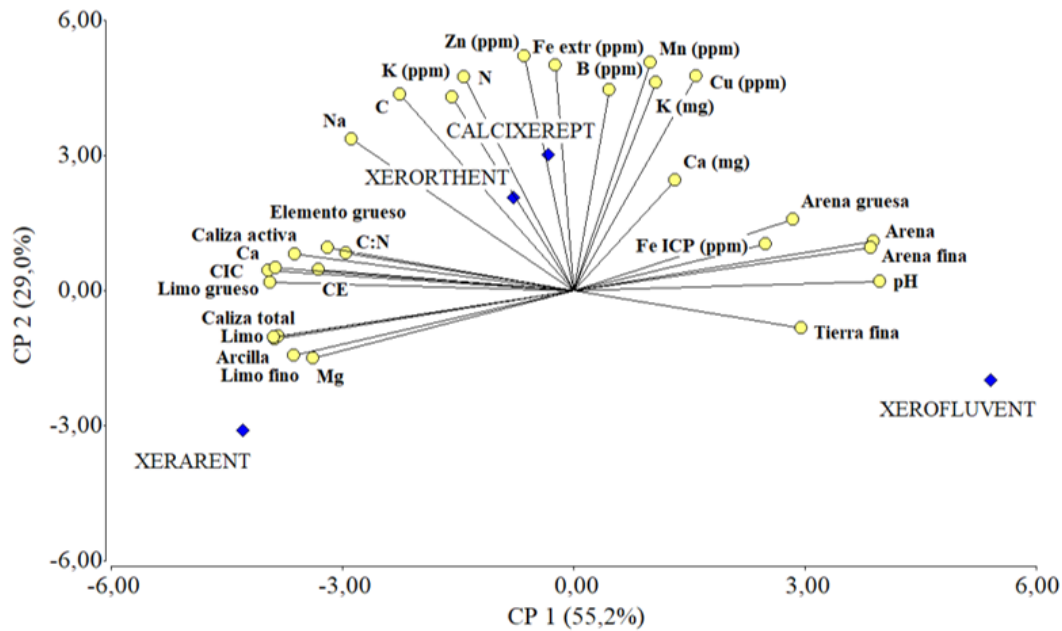


**Figura 6.2:** Difractograma resultante del análisis de agregados orientados de los suelos de las parcelas **A:** PDC09 y **B:** PSTM08. Los diferentes tratamientos se muestran en negro (-), verde (-) y rojo (-). El trazo negro (-) muestra las cuentas de refracción por sedimentación sin tratamiento (AO), en verde (-) por saturación con etilenglicol (AOEG) y en rojo (-) mediante tratamiento térmico (AOTT).

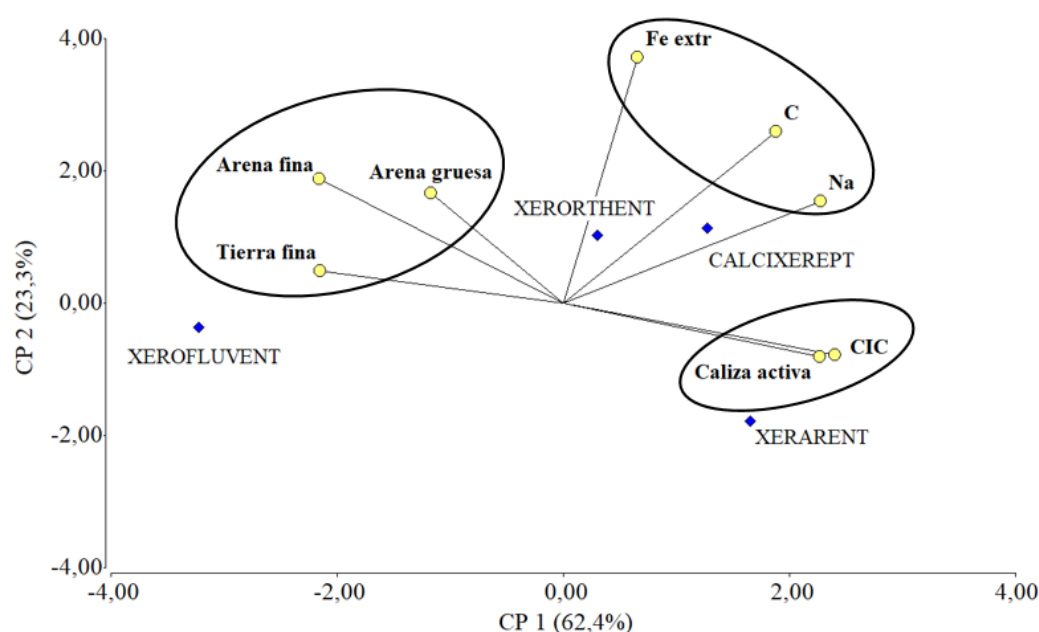
activas en los microorganismos y la vida, y reguladores de procesos osmóticos, tanto en la microbiota edáfica como en las células vegetales. Los iones que se han cuantificado, en ppm, mediante espectrometría de emisión atómica ionizada con plasma los siguientes elementos: Ca, Mg, Na, K, Fe (total y extractable), Cu, Mn, Zn y B. Los datos extraídos se han procesado mediante el cálculo vectorial de componentes principales para establecer qué variables son más representativas para la de los diferentes suelos atendiendo a su taxonomía (USDA, 2014). El Análisis de Componentes Principales (PCA) incluye las 33 variables analizadas en las parcelas estudiadas (Figura 6.3). El análisis PCA consiste en la combinación lineal de las distintas variables estudiadas y la representación gráfica en dos dimensiones de los vectores (variables) y tipos de suelo. Este análisis permite la agrupación de los 4 tipos de suelo según la taxonomía USDA (*XEROFLUVENT*, *XERARENT*, *XERORTHENT* y *CALCIXEREPT*). Cada eje representado corresponde a una componente (o combinación lineal de variables) de las cuales obtenemos un porcentaje de variabilidad explicada por la suma de componentes principales (CP1+CP2), estas componentes principales son la combinación lineal de las variables estudiadas en las proporciones indicadas por los autovectores descritos en el *Anexo C*. Aunque las componentes principales explican un alto porcentaje de variabilidad, no se encontró una agrupación que determinara la singularidad de las parcelas, atendiendo a su taxonomía. Por este motivo se eliminaron variables redundantes, esto es, que proporcionaban la misma información que otras, con el objetivo de recuperar los mismos resultados con un menor número de variables, más fáciles de medir y simplificando de este modo el análisis.

Debido a que el análisis de componentes principales de la totalidad de variables estudiadas no permite una agrupación taxonómica de suelos. Se realizó un estudio de variables, determinadas como relevantes para la clasificación de los suelos estudiados según la USDA (Figura 6.4). Estas variables se basan en las medidas de *tierra fina*, *arena fina*, *arena gruesa*, *hierro extractable*, *contenido de carbono*, *sodio*, *caliza activa* y *capacidad de intercambio catiónico*. La clasificación de los suelos de Pago de Carraovejas atiende a 4 grupos taxonómicos, según datos cedidos del proyecto ITISOST: *XEROFLUVENT*, *XERARENT*, *XERORTHENT* y *CALCIXEREPT*. Se puede observar en la Figura 6.3 que los suelos definidos taxonómicamente como *XERARENT* se relacionan con las variables *Caliza activa* y *CIC* (Capacidad de Intercambio Catiónico). En el caso de los suelos *XEROFLUVENT*, las variables que definen esta taxonomía son *Tierra fina*, *Arena fina* y *Arena gruesa*. Para los tipos taxonómicos de suelos *XERORTHENT* y *CALCIXEREPT* las variables ligadas a estos son el *Fe ext* (hierro extractable), *C* (contenido en carbono) y *Na* (sodio). Mediante este análisis se definen 3 grupos de variables que permiten diferenciar los 4 tipos

taxonómicos de suelos. Aunque en la clasificación de los suelos *XERORTHENT* y *CALCIXEREPT* no se obtiene muy buena separación por el análisis de componentes principales y podríamos considerar que pertenecen a un mismo tipo de suelo. Por este motivo se realiza un análisis PCA con las variables descritas anteriormente y se amplía el análisis con otras variables texturales fácilmente medibles en el suelo como son el porcentaje de arena y arcilla.



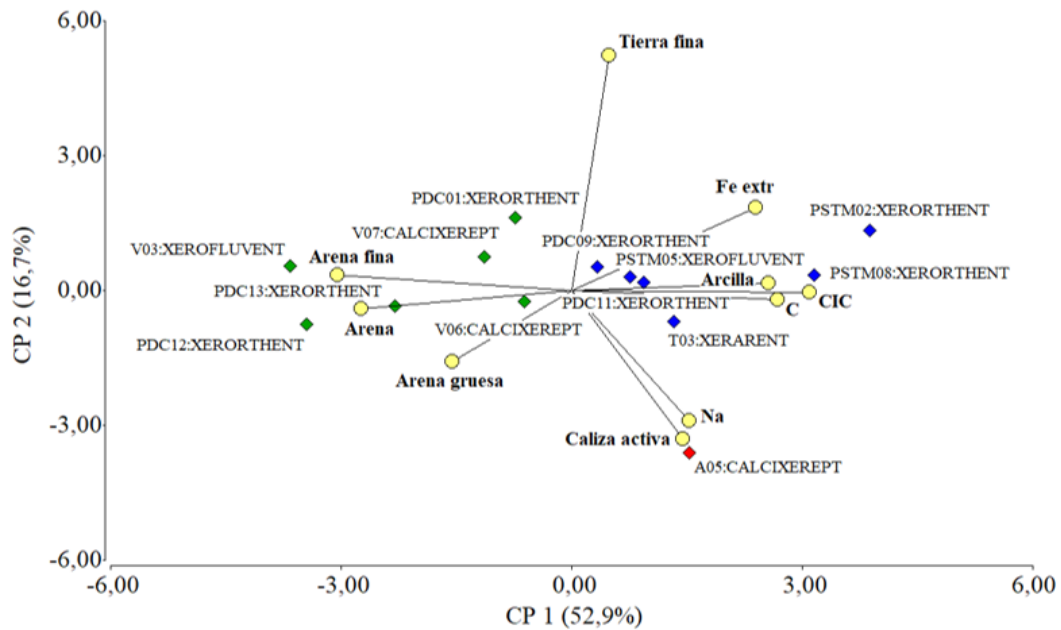
**Figura 6.3:** Análisis de componentes principales de los suelos clasificados mediante taxonomía USDA. Las variables representadas atienden a características texturales: Elemento grueso, Arena, Arena gruesa, Arena fina, Tierra fina, Limo, Limo grueso y Limo fino. Se incluyen también las variables electroquímicas y de intercambio catiónico: Caliza total, Caliza activa, pH, CE (Conductividad Eléctrica) y CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico). Las variables restantes se clasifican por su capacidad nutricional o cofactores enzimáticos, definidas por el símbolo químico correspondiente. Los datos utilizados para la realización del PCA se obtienen del Proyecto ITISOST realizado en la Finca Pago de Carraovejas.



**Figura 6.4:** Análisis de componentes principales de los suelos clasificados mediante taxonomía USDA. Las variables implicadas en la clasificación de las parcelas son: C (contenido de carbono), CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico), Fe extr (hierro extractable), Tierra fina, Arena fina, Arena gruesa, y Caliza activa.

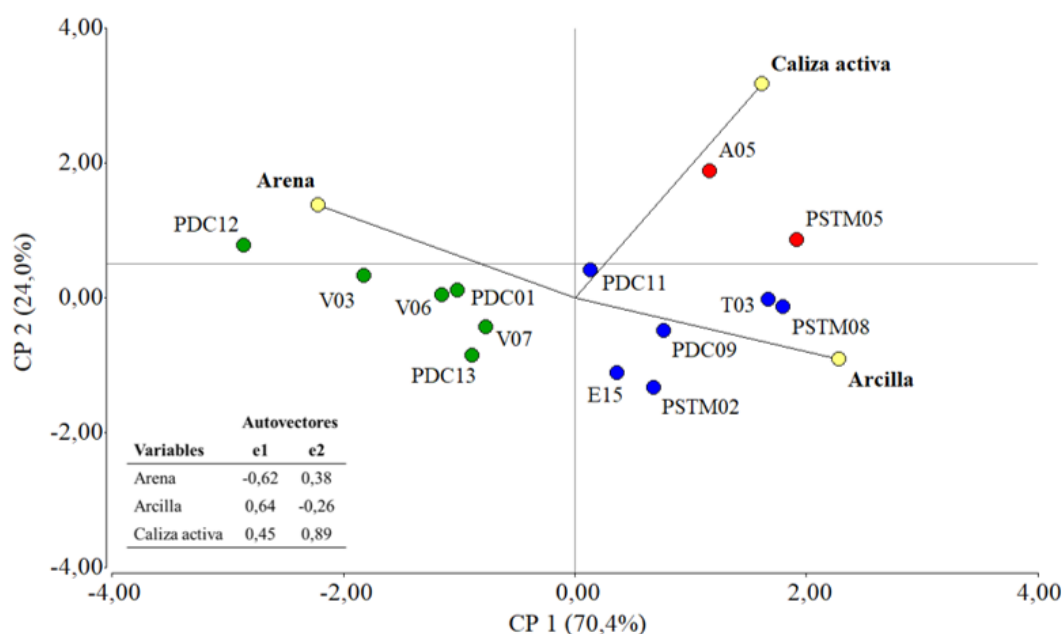
La geomorfología de los suelos vitícolas de Pago de Carraovejas se muestra muy homogénea, debido a la combinación de rocas calcáreas de la era mesozoica junto con arenas eólicas y material de tamaño más pequeño, como son las arcillas depositadas por la acción del curso del arroyo Botijas. Las diferencias texturales que se han encontrado se relacionan, por tanto, con la energía impresa en los diferentes materiales. En las zonas de ladera la pendiente favorece un arrastre de materiales calcáreo hacia las zonas más bajas. Mientras que la influencia pretérita del curso fluvial del río depositó las arcillas que se encuentran en el fondo del valle. Esta acción de arrastre también comprende la deposición de arenas, aunque la principal causa de la presencia de arenas es la acción del viento, con dirección SO, que ha erosionado y transportado estos materiales desde finales del Cenozoico (Pleistoceno).

Debido a la homogeneidad taxonómica que presentan los suelos de la finca de Pago de Carraovejas (Figura 6.4), se han verificado las variables que permitían una explicación en la separación de grupos más resolutiva mediante el mínimo número de variables posible. Se encontraron dos variables texturales



**Figura 6.5:** Análisis de Componentes principales de las parcelas estudiadas atendiendo a la taxonomía del suelo según USDA. Las variables usadas para este test: C (contenido de carbono), CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico), Fe extr (hierro extractable), Tierra fina, Arena fina, Arena gruesa, Caliza activa, Arena y Arcilla.

definidas por el porcentaje de arcillas y arenas, y otra variable basada en la cuantificación de la caliza activa en el suelo, esta variable afecta de forma directa al pH, siendo la relación entre ambos parámetros positiva. El análisis de estas tres variables permite la clasificación de las parcelas de forma explícita en 3 grupos. Atendiendo únicamente a las variables *Arena* y *Arcilla* se observa una agrupación lineal, en gradiente direccionado con el vector de las citadas variables, que define las parcelas por su porcentaje de arena y arcilla. Dada la sencillez en la medida de la textura del suelo, y observando que se relacionan de manera muy similar a otras variables como, se decide la utilización de los datos porcentuales de arenas, arcillas y caliza activa para los posteriores análisis. Por ejemplo la variable *Arcilla* se relaciona con limo y magnesio, *Arena* con el pH y *Caliza activa* con CIC (Capacidad de intercambio Catiónico) como se observa en la Figura 6.5. Por tanto, se seleccionaron las parcelas más cercanas a la variable en cuestión y se reclasificaron en relación a su porcentaje de arena, arcilla y/o caliza, se crearon tres grupos de parcelas: **ARN** (arenosas), **ARC** (arcillosas), **CAL** (calizas).



**Figura 6.6:** Análisis de componentes principales con indicación de las tres variables más representativas para la agrupación de parcelas. La CP1 permite la separación de parcelas arenosas o ARN ( $CP1 < 0$ ) de las no arenosas (calizas o CAL y arcillosas o ARC) en la  $CP1 > 0$ . Las parcelas CAL y ARC se separan mediante la CP2, siendo  $CP2 > 0$  en parcelas calizas y  $CP2 < 0$  en parcelas arenosas. Las variables representadas se definen en medidas porcentuales.

Para comprobar que la agrupación realizada permitía separar los suelos atendiendo a las características texturales de estos, se realizó un PCA de las parcelas filtradas por arenosas, arcillosas y calizas. Las parcelas se resolvieron en tres grupos ligados o cercanos al vector representado de cada variable (*Arena*, *Arcilla*, *Caliza activa*). Esta clasificación mediante las 3 variables permite agrupar las parcelas estudiadas, explicando la variabilidad observada con un 94,4% de confianza, siendo este valor la suma de las componentes principales  $CP1=70,4\%$  y  $CP2=24,0\%$ . En consecuencia, podemos obviar el resto de variables estudiadas por su carácter redundante en este análisis. Verificando, de esta forma, la decisión de clasificar atendiendo exclusivamente a sus características texturales (Figura 6.6).

### 6.1.3. Capacidad de retención hídrica

La eficacia del suelo para retener agua disponible para la hidratación vegetal se define como Capacidad de Campo (CC). También resulta interesante la medida del parámetro denominado Punto de Marchitez Permanente (PMP)

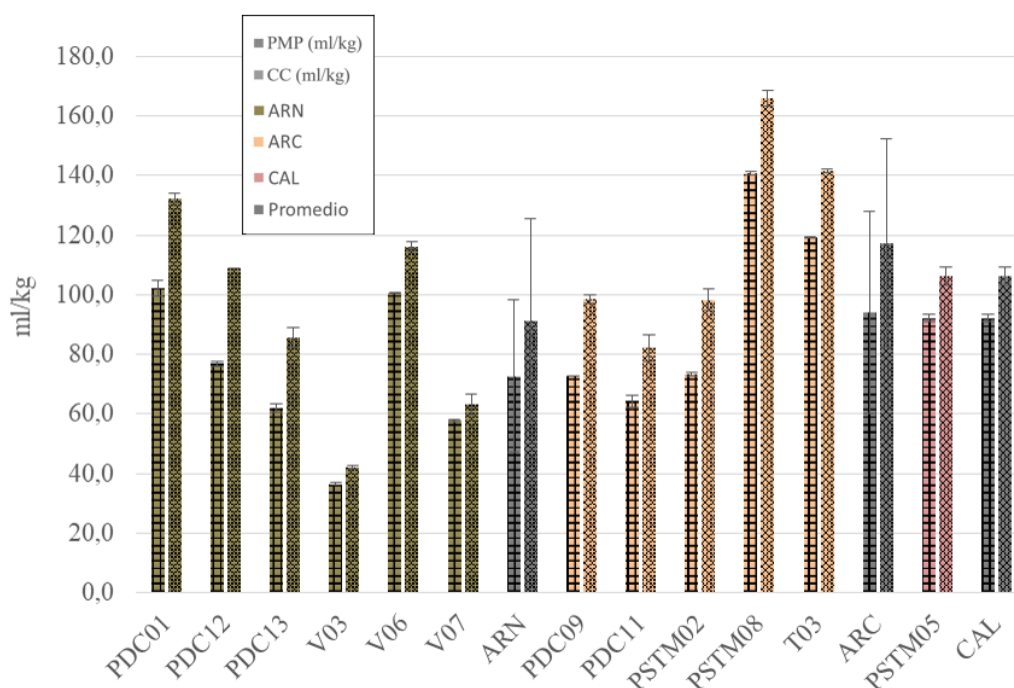
que determina el contenido mínimo de agua que retiene un determinado suelo y es accesible para la planta. Las técnicas empleadas para la obtención de los valores de CC y PMP se detallan en la *Sección 1.1* de la *INTRODUCCIÓN*.

La necesidad de calcular este parámetro se debe a la influencia que tiene la cantidad de agua del suelo respecto al análisis bioquímico o enzimático de la muestra de suelo. La cantidad de agua define, por diferencia, la cantidad de aire disponible en el suelo dependiendo de su textura. Para la normalización del agua accesible en un determinado suelo (ya sea arcilloso, arenosos o calizo) en los siguientes análisis enzimáticos es necesario que todas las muestras de suelo se saturen hasta el 60% de Capacidad de Campo. Esta normalización permite un cálculo de la actividad enzimática de forma precisa, evitando sesgos en suelos arenosos, arcillosos o calizos.

Los datos obtenidos de capacidad de campo en las muestras analizadas determinan suelos con diferentes valores de retención de agua en Capacidad de Campo, entre un mínimo de  $42,1 \pm 0,7$  ml/kg en la parcela V03 y un máximo de  $166 \pm 3$  ml/kg en la parcela PSTM08 (Figura 6.7).

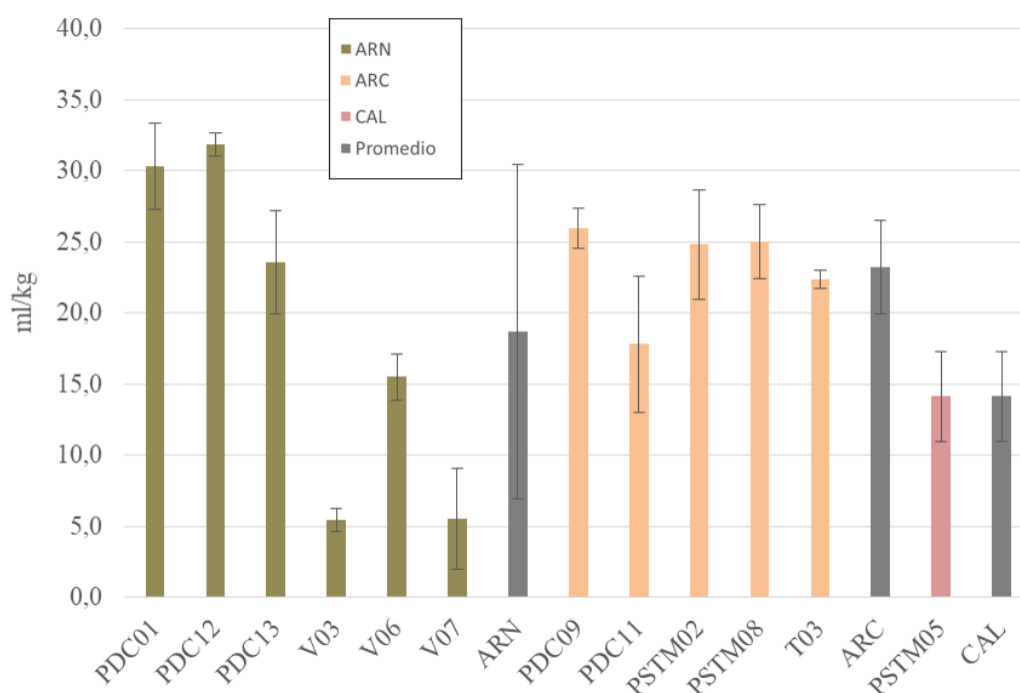
En orden creciente a los valores de Capacidad de Campo (CC), los suelos se distribuyen en arcillosos (ARC), calizos (CAL) y arenosos (ARN). El promedio de CC de las parcelas arenosas (PDC01, PDC12, PDC13, V03, V06 y V07) es  $91 \pm 34$  ml/kg, en este grupo ARN las parcelas V03 y V07 son las que presentan una CC menor. Las parcelas clasificadas como arcillosas (PDC09, PDC11, PSTM02, PSTM08 y T03) muestran un valor de  $117 \pm 35$  ml/kg, en promedio, mayor a las parcelas arenosas. Por último del suelo de la parcela caliza PSTM05 se obtiene un valor de  $CC = 106 \pm 3$  ml/kg.

Si bien, la CC y el PMP determinan la capacidad de retención de agua de un determinado suelo, también es interesante el cálculo del Agua Disponible (AD) para la hidratación vegetal. Por tanto, el agua disponible para la vid se encuentra entre la presión mínima que ejerce el sistema radicular (-0,33 bares), mediado por la evapotranspiración foliar y la presión máxima a la que puede trabajar un sistema vegetal para la extracción de agua en un determinado suelo (-15,00 bares). Aunque es posible que en un suelo encharcado la presión del agua permita, de forma espontánea, la hidratación vegetal, el sistema radicular no soportaría tensiones de oxígeno que tiendan a 0. Es por este motivo que se define la CC en 0,33 bares, definiendo suelos no saturados de agua. De la misma forma que un suelo extremadamente seco, aunque contenga agua, no podrá permitir la hidratación vegetal y, por tanto, la planta se marchitará de forma irreversible si no cambian las condiciones hídricas.



**Figura 6.7:** Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente de los 12 suelos estudiados. ARN: Arenosas, ARC: Arcillosa, CAL: Caliza. El promedio de los valores las parcelas se sitúa inmediatamente a la derecha de cada tipo de suelo en una barra gris. Las barras de error indican el error muestral y técnico en ARN, ARC y CAL y la desviación en el caso de los promedios.

El agua disponible en los suelos arenosos (ARN) se define en dos grupos muy distantes por su valor de retención. El primer grupo está representado por las parcelas V03 y V07, en cuyo caso el valor de agua disponible se sitúa en  $5,5 \pm 0,8$  y  $6 \pm 4$  ml/kg. Sin embargo, en el segundo grupo de ARN (PDC01, PDC12, PDC13 y V06) los valores fluctúan entre  $16 \pm 2$  y  $31,9 \pm 0,8$  ml/kg. En promedio, los suelos ARN definen un promedio de  $AD = 19 \pm 12$  ml/kg. A diferencia de las parcelas ARN, las parcelas ARC y CAL no presentan una división de grupos tan acusada. En el caso de los suelos ARC (parcelas PDC09, PDC11, PSTM02, PSTM08 y T03) el valor promedio de  $AD = 23 \pm 3$  ml/kg y en el caso de las parcelas CAL el valor promedio se sitúa en  $14 \pm 3$  ml de agua/kg de suelo (Figura 6.8).

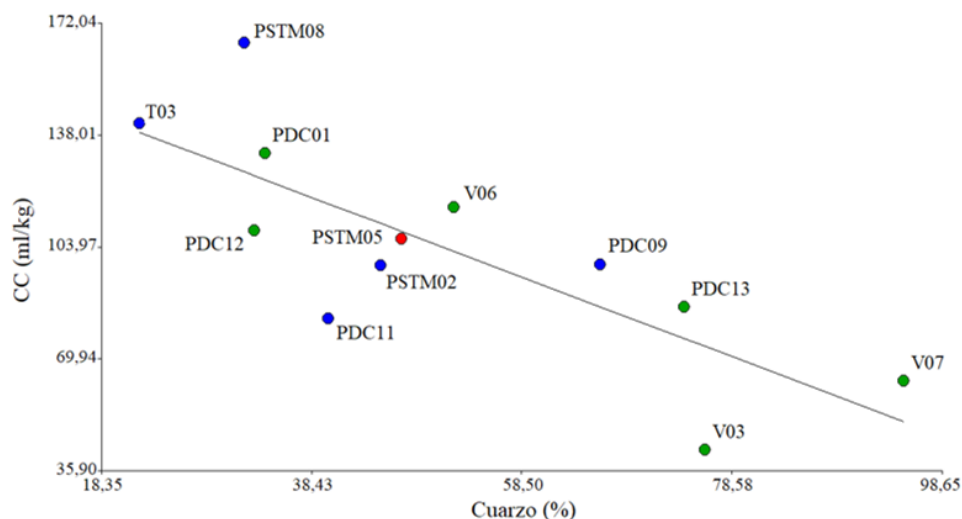


**Figura 6.8:** Agua disponible en los suelos de las parcelas estudiadas. ARN: Arenosa, ARC: Arcillosa, CAL: Caliza. En abscisas se muestran los valores de agua disponible de cada parcela el promedio de las parcelas arenosas, arenosas no calizas y arcillosas. Las barras del promedio muestra la desviación.

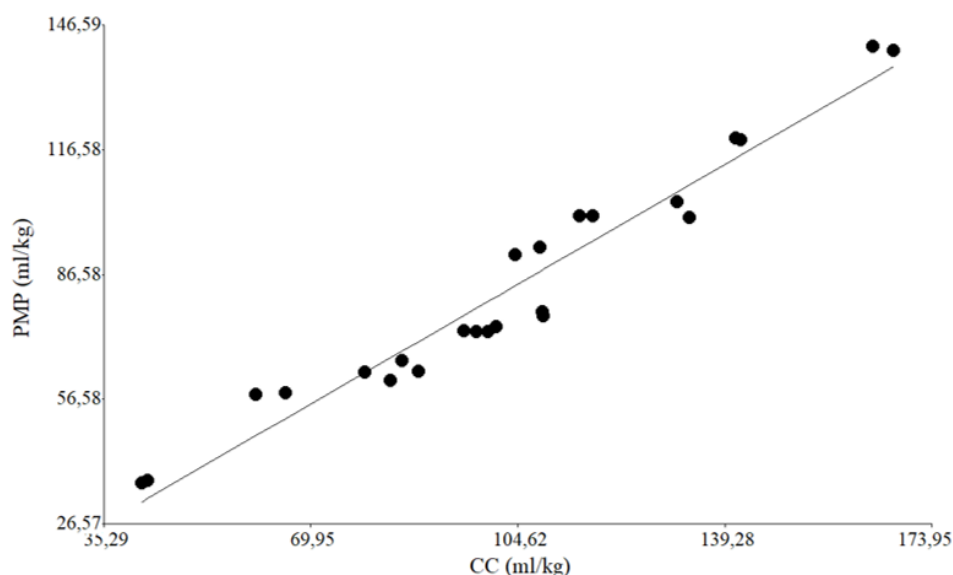
La capacidad de campo del suelo puede estar condicionada por los minerales que este contiene. Las arcillas o filosilicatos, como hemos visto en la *Sección 1.1.3*, tienen una alta capacidad de retención hídrica. En contraste, minerales como el cuarzo permite la eliminación del agua gravitacional debido a que no tienen capacidad de hinchamiento y no es posible la retención por capilaridad de agua tan eficaz debido a la relación superficie/volumen de las partículas de mineral. Este suceso se ha comprobado mediante regresión lineal entre la Capacidad de Campo (CC) y el contenido de cuarzo (%) de cada parcela estudiada en el Proyecto ITISOST. En la Figura 6.9 se observa un ajuste de las parcelas en relación a CC y cuarzo que explica un 78% de la variabilidad observada. Las parcelas PSTM08, V03 y PDC11 son las que se encuentran más alejadas del ajuste lineal.

Por último, se ha comprobado que los parámetros de CC y PMP se correlacionan de forma positiva. Este análisis permite la verificación del cálculo de agua disponible (AD) en el suelo, recordemos que el Agua Disponible (AD) es la diferencia entre la Capacidad de Campo (CC) y el Punto de Marchitez

Permanente (PMP),  $AD = CC - PMP$ . En la Figura 6.10 se observa que el ajuste lineal de los parámetros hídricos, los cuales se ajustan al 95 % de confianza ( $R^2=0,95$ ).



**Figura 6.9:** Recta de regresión lineal, ajustada por mínimos cuadrados, del área integrada del cuarzo y la capacidad de campo de cada una de las 12 parcelas analizadas. El ajuste de la recta predictora es  $R=0,78$ . La ecuación de la recta:  $CC(\text{Capacidad de Campo})=-1,21Q(\text{Cuarzo})+165,35$ .



**Figura 6.10:** Regresión lineal de los parámetros hídricos CC y PMP.  $R^2(\text{ajustada}) = 0,95$ ;  $p\text{-valor} < 0,0001$ .

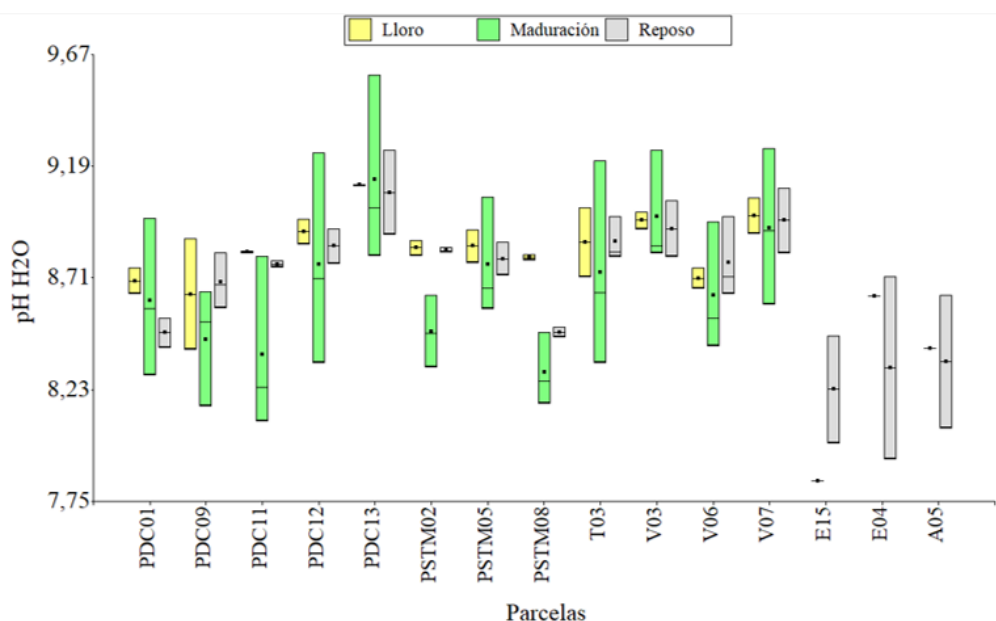
#### 6.1.4. Propiedades electroquímicas del suelo. Conductividad y pH.

Los cambios en los valores de pH en el suelo condicionan la diversidad microbiana en el suelo y, por tanto, la mineralización de nutrientes presentes en este. Siendo esta variación un parámetro determinante en el establecimiento del consorcio microbiano adecuado para la fertilidad de un suelo vitícola que promueva la adquisición facilitada de nutrientes hacia y para la vid, como se detalla en la *INTRODUCCIÓN Sección 1.1.2*. Aunque se produzcan modificaciones en los integrantes de la comunidad microbiana de forma estacional, este parámetro electroquímico va a ser una variable predictora de las posibles poblaciones microbianas que podemos encontrar en el suelo.

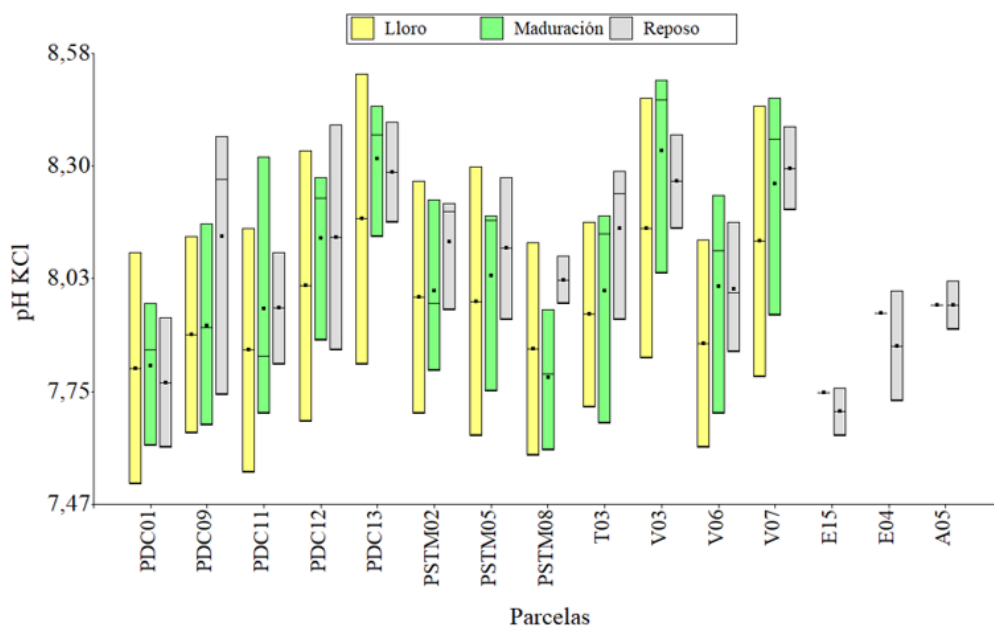
Las moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el suelo tienen diferente carga, dependiendo del valor del pH en un determinado suelo. Por este cambio en la polaridad, los nutrientes presentes pueden estar bio-disponibles o no para la planta.

También se ha analizado la influencia de sales de calcio, como el  $\text{CaCO}_3$ , ampliamente representadas en la finca. En caso de sustitución con iones divalentes, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , el pH del suelo disminuye y permite el pronóstico de valores de pH en caso de fuerte pluviosidad y el consecuente desplazamiento por gravedad de material calcáreo.

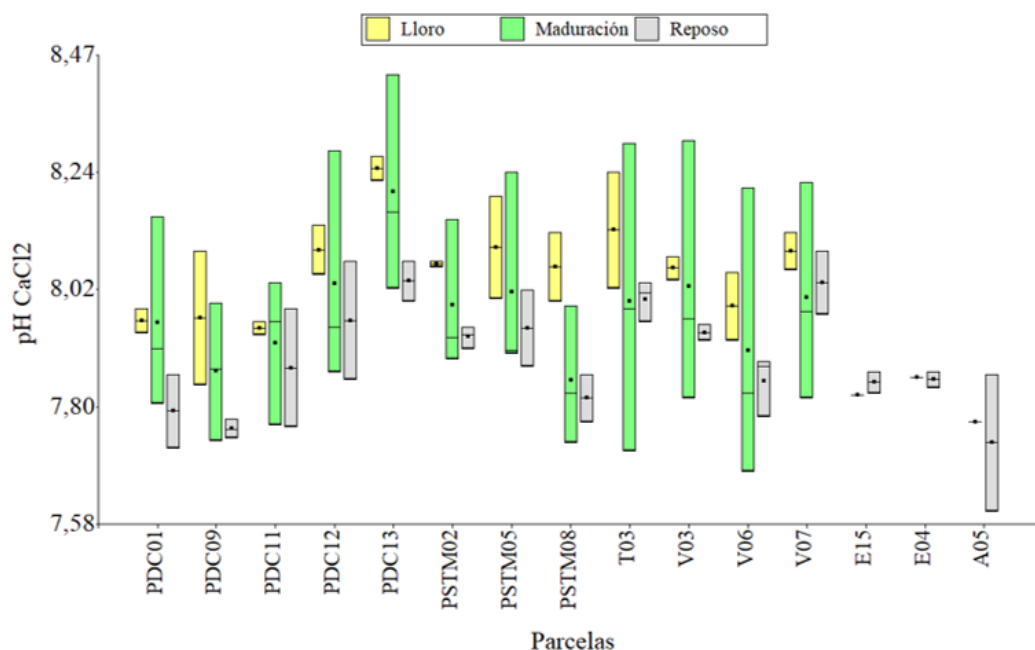
Las medidas del pH en agua destilada permite el cálculo de este parámetro en el suelo como si se tratara de un proceso de hidratación natural provocado por la lluvia, por ejemplo. En la Figura 6.11 se observa la variación del pH en el suelo de cada parcela estudiada y en cada estado fenológico de la vid. En general los valores de pH en lloro, maduración y reposo se mantienen constantes y con tendencia alcalina. El valor mínimo de pH en las parcelas estudiadas corresponde a  $7,84 \pm 0,01$  en E15 y máximo de  $9,58 \pm 0,04$  en la parcela PDC13, ambos en maduración y en 2017 y 2016 respectivamente. Aunque hay variaciones en las parcelas PDC01, PDC11 y PSTM02 que vamos a comentar a continuación. En la parcela PDC01 el valor de pH en lloro es mayor que en reposo, siendo el pH en maduración muy variable. En el caso de la parcela PDC11 el pH en maduración desciende y en reposo aumenta 0,5 respecto a maduración. En la parcela PSTM02 se observa un pH mayor en lloro mientras que en maduración desciende. En general encontramos pH más variables en el estado fenológico de maduración. En cualquier caso los datos de pH observados indican diferencias significativas entre reposo, lloro y maduración con una confianza del 95 % (p-valor=0,0453).



**Figura 6.11:** Valores de pH medidos en agua destilada en las diferentes parcelas estudiadas siguiendo la normativa ISO 10390:2005. Los datos se muestran clasificados en los tres estados fisiológicos de la vid más relevantes: lloro, reposo y maduración.



**Figura 6.12:** Valores de pH medidos en KCl en las diferentes parcelas estudiadas siguiendo la normativa ISO 10390:2005. Los datos se muestran clasificados en los tres estados fisiológicos de la vid más relevantes: lloro, reposo y maduración.



**Figura 6.13:** Valores de pH medidos en  $\text{CaCl}_2$  en las diferentes parcelas estudiadas siguiendo la normativa ISO 10390:2005. Los datos se muestran clasificados en los tres estados fisiológicos de la vid más relevantes: lloro, reposo y maduración.

El valor de pH del suelo desciende cuando aplicamos un fertilizante químico compuesto por una sal monoprótica como, por ejemplo, el  $\text{KNO}_3$ . Este proceso de sustitución catiónica se encuentra detallado en la *INTRODUCCIÓN* (Sección 1.1.2). Las medidas realizadas en los suelos vitícolas estudiados muestran un descenso general del valor del pH en medidas con  $\text{KCl}$  respecto a las medidas en agua destilada (Figura 6.12). Si bien no se encuentran diferencias significativas entre los estados de lloro, reposo y maduración ( $p$ -valor=0,46).

En cuanto a las medidas efectuadas con  $\text{CaCl}_2$  se observan diferencias significativas entre los estados fisiológicos de reposo, lloro y maduración ( $p$ -valor=0,0002). Estas diferencias se deben a un descenso significativo del pH en reposo en las parcelas pertenecientes al grupo PDC.

## 6.2. Discusión

Los datos obtenidos mediante DRX permiten determinar la retención de agua en un suelo en base al porcentaje de silicatos presentes en la muestra. Además, y como se ha descrito anteriormente con ayuda de la Figura 6.9, este

valor de retención de agua a capacidad de campo (CC) se relaciona (78 % de confianza) con la medida de CC por sobre-presión en la cámara de Richards. También sería posible predecir la acidez de un suelo mediante el estudio por DRX. Ya que, la acidez de un suelo también depende del porcentaje de silicatos o arenas presentes en el mismo (Swędrzyńska & Grześ, 2015). Por otra parte los suelos de las parcelas PDC11, PDC12 y T03 analizados mediante DRX muestran porcentajes de calcita elevados (32,4-38,9) % que se han contrastado con los datos de los que dispone la bodega y se confirma un elevado porcentaje de caliza relacionado con el aumento de pH.

Los valores deseables para un suelo en el que se cultive vid están entorno a 5,4-6,8 (Castellanos, 2014), lo que concuerda con los valores observados en la bibliografía. Las medidas de pH que se han obtenido corresponden a suelos moderadamente básicos con valores de pH, medidos en agua, superiores a  $7,84 \pm 0,01$  e inferiores a  $9,58 \pm 0,04$  aunque el promedio del pH de todas las parcelas durante este estudio se mantiene en  $8,71 \pm 0,31$ . La desviación indica suelos homogéneos ya que sólo varían en 0,31 respecto de la media. Las medidas del pH del suelo de las parcelas estudiadas supera en 1,9 al valor máximo deseable para el cultivo de vid y 2,8 si comparamos el máximo deseable con el máximo registrado en la parcela PDC13 en el estado fenológico de maduración ( $9,58 \pm 0,04$ ). Es posible que en esta parcela se registre un pH alto en promedio de  $9,10 \pm 0,24$  debido a que se aplica un riego mayor y que el agua de riego podría tener un pH alcalino. Esta situación supone una baja bio-disponibilidad de fósforo y un aumento en los niveles de calcio y magnesio (Castellanos, 2014; Osorio, 2012). Puede ser una razón por el aumento de bacterias movilizadoras de fósforo que suplan el déficit de fósforo disponible para la vid. El pH del suelo también se ha medido en solución de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{KCl}$ . Estas medidas informan del pH en el caso de sustitución, en las partículas coloidales, del ión  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{K}^+$  por el ión  $\text{H}^+$ . Este intercambio catiónico resulta en valores de pH menores a los medidos con agua. Se simula, de esta forma, el desplazamiento del material calcáreo en el suelo o la aplicación de un abono inorgánico como el  $\text{KNO}_3$ , estos iones liberarían el catión  $\text{H}^+$  acidificando el suelo. En este estudio se verifica la ausencia de aplicación de abonos orgánicos debido a que la desviación típica del pH medido en  $\text{KCl}$  no es variable entre los estados fisiológicos de la vid, en el caso de una posible aplicación observaríamos una desviación de medias significativa (Figura 6.11). En el caso de la medida del pH con  $\text{CaCl}_2$  se observa un acusado descenso en el grupo de parcelas PDC debido al arrastre de material calcáreo durante el invierno por eventos pluviales.

En cuanto a la capacidad de retención del agua del suelo se observan valores de Agua Disponible (AD) en promedio de  $5 \pm 1$  ml/kg de agua. Si bien existen

parcelas en el grupo ARN (Arenosas) que difieren el comportamiento de las demás. Es el caso de V03 y V07. El tamaño de grano de las arenas influye en la capacidad de retención del agua. A mayor tamaño de grano menor capilaridad y, por tanto, el agua gravitacional percola más fácilmente. En la parcela V03 y V07 se han registrado porcentajes de arena gruesa de 15,3 y 11,20 %. Mientras que en el resto de arenosas este porcentaje se encuentra entorno al 8 % de arena gruesa. Ahora bien, las parcelas arcillosas deberían presentar un mayor valor de AD pero en este estudio no se confirma una mayor retención hídrica en el suelo disponible para la planta. El resto de parcelas arenosas (PDC01, PDC12 y PDC13) presentan valores más altos que en el caso de las parcelas ARC. Este comportamiento del suelo en relación a la retención de agua podría estar relacionado con la aplicación de pellets orgánicos de oveja que se realiza en estos suelos por falta de materia orgánica. La materia orgánica que se aplica a estos suelos puede retener mayor cantidad de agua que si se tratara de suelos arenosos sin aplicación de enmiendas. Aunque no se ha proyectado en este estudio la cuantificación de hongos micorrícicos, es bien sabido que modifican la estructura del suelo y, por este motivo, es posible que los suelos con una mayor población de hongos micorrícicos retengan un mayor volumen de agua independientemente si son arenosos o no (Augé *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 6. CARACTERIZACIÓN MINERALÓGICA, FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO

# 7. INDICADORES MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA CALIDAD Y FERTILIDAD DE SUELOS AGRÍCOLAS

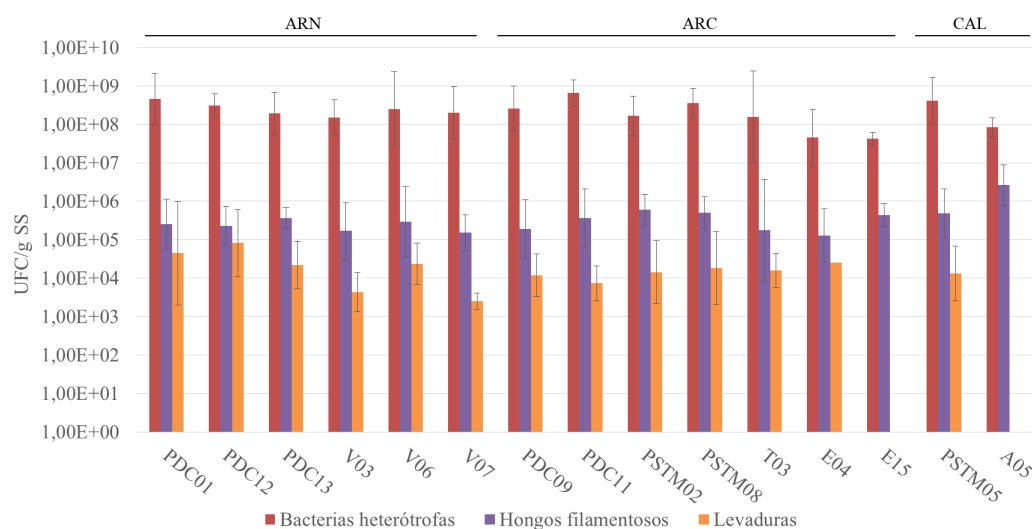
## 7.1. Resultados

En esta sección se muestran los datos obtenidos mediante el recuento de los microorganismos del suelo de las parcelas vitícolas estudiadas. Los resultados obtenidos corresponden a la microbiota de los grupos mayoritarios que participa de forma activa en el suelo. Estos grupos microbianos generales son las bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras. Además se exponen los datos de recuento de microorganismos que resultan interesantes por su implicación en la fertilidad del suelo destinado a explotación agraria. También se detallan los resultados obtenidos de los análisis de actividad enzimática del suelo. Por último, mediante el estudio enzimático del suelo, se determina la actividad de la microbiota edáfica en los ciclos del nitrógeno, carbono y fósforo.

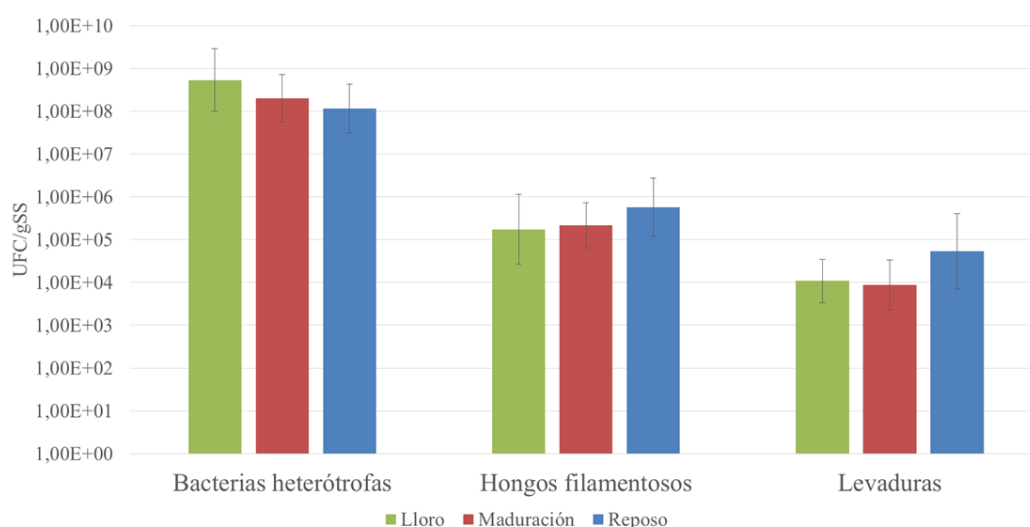
### 7.1.1. Recuento de la microbiota viable general

El recuento de la microbiota general del suelo nos permite cuantificar la concentración de bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras en las muestras obtenidas. Los datos de recuento se han extraído mediante crecimiento en medio de cultivo sólido y siguiendo la metodología del Número Más Probable (NMP) descrito en la *Sección 4.4.1* en *MATERIAL Y MÉTODOS*.

Los resultados del recuento promedio de bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras en el suelo se han filtrado atendiendo al estado fenológico de la vid. En la Figura 7.1 se observa un aumento notable del recuento de bacterias heterótrofas en la fase de lloro. El incremento de la población de bacterias en el estado fenológico de lloro es del 90 % con respecto a los estados de reposo y maduración, siendo estadísticamente significativo este incremento ( $p$ -valor=0,0001). Los estados de reposo y maduración se muestran como grupos homogéneos por comparación de medias, no se aprecian diferencias significativas en la población de bacterias heterótrofas entre estos dos estados. En cuanto a los recuentos de levaduras, se observa un recuento máximo de  $1,00 \cdot 10^5$  UFC/g SS en reposo, diferenciándose significativamente de lloro y maduración ( $p$ -valor=0,0014). En lloro y maduración el recuento es menor, presentando valores de  $1,72 \cdot 10^4$  y  $1,26 \cdot 10^4$  UFC/g de suelo seco respectivamente y presentándose como grupos homogéneos entre sí. Atendiendo al recuento de hongos filamentosos se observa en reposo una concentración de  $1,62 \cdot 10^6$  UFC/g SS, siendo el máximo valor observado en promedio. Seguido de  $6,37 \cdot 10^5$  UFC/g SS en maduración y de  $2,51 \cdot 10^5$  UFC/g SS en lloro. El recuento de hongos filamentosos en reposo es estadísticamente significativo respecto a maduración y lloro, presentando un  $p$ -valor=0,0067 (Figura 7.1).

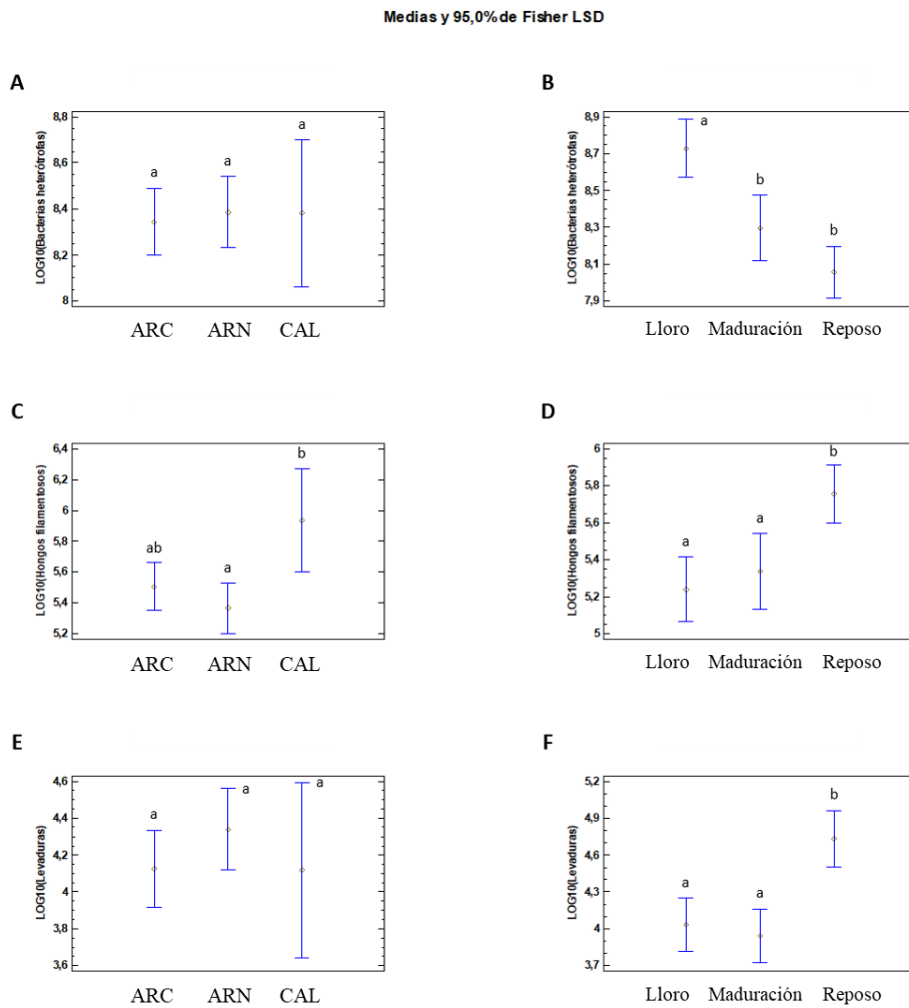


**Figura 7.2:** Recuento microbiológico de bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras viables en el suelo, desde el año 2015 y hasta el año 2018. Los datos se muestran por parcelas agrupadas por suelo arenoso (ARN), arcilloso (ARC) y calizo (CAL). La concentración se expresa en Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en cada gramo de Suelo Seco (SS) en escala logarítmica.



**Figura 7.1:** Recuento microbiológico de bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras viables en el suelo. Los datos obtenidos, desde el año 2015 y hasta el año 2018, se filtran en base a los tres estado fenológicos de la vid: Reposo ( $n=108$ ), lloro ( $n=72$ ) y maduración ( $n=108$ ). La concentración se expresa en Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en cada gramo de Suelo Seco (SS) en escala logarítmica. Las barras de error corresponden al logaritmo de la desviación.

Se representa, también, en la Figura 7.2 el promedio de los recuentos microbianos de bacterias heterótrofas, hongos filamentosos y levaduras por parcela. El valor representado para cada parcela se ha obtenido de los datos promediados del recuento en los estados de reposo, lloro y maduración. Los resultados observados definen a la parcela T03 por su recuento máximo de bacterias heterótrofas ( $7,46 \cdot 10^9$  UFC/g SS) durante el periodo de estudio. En contraste con lo que ocurre en la parcela T03, se observa que la parcela E04 (sin cultivar en el momento de recogida de la muestra) presenta el menor recuento promedio de bacterias heterótrofas viables ( $4,43 \cdot 10^7$  UFC/g SS). En cuanto a los valores obtenidos en recuento de levaduras se observa que la parcela PDC01 presenta una concentración de  $6,44 \cdot 10^5$  UFC/g SS, siendo esta parcela en la cuál se observa el máximo recuento de levaduras. En las parcelas E04 y A05 no se evidencia la presencia de levaduras en el suelo durante el periodo de estudio. Y en parcelas como V07 o V03, se obtienen recuentos de entre  $1,37-1,98 \cdot 10^3$  UFC/g SS. El recuento de hongos filamentosos en las muestras de suelo de las diferentes parcelas se mantiene, en promedio, con valores cercanos a  $1 \cdot 10^6$  UFC/g SS.



**Figura 7.3:** Test de Fisher LSD para comparación de medias de los recuentos de los principales grupos microbianos, desde el año 2015 y hasta el año 2018, en relación al tipo de suelo y al estado fisiológico de la vid (lloro, maduración, reposo) con una confianza del 95,0%. **A:** Concentración promedio de bacterias heterótrofas *vs.* tipo de suelo. **B:** Concentración promedio de bacterias heterótrofas *vs.* estado fisiológico de la vid. **C:** Concentración promedio de levaduras *vs.* tipo de suelo. **D:** Concentración promedio de levaduras *vs.* estado fisiológico de la vid. **E:** Concentración promedio de hongos filamentosos *vs.* tipo de suelo. **F:** Concentración promedio de hongos filamentosos *vs.* estado fisiológico de la vid. **ARC:** Arcillosa, **ARN:** Arenosas, **CAL:** Calizas.

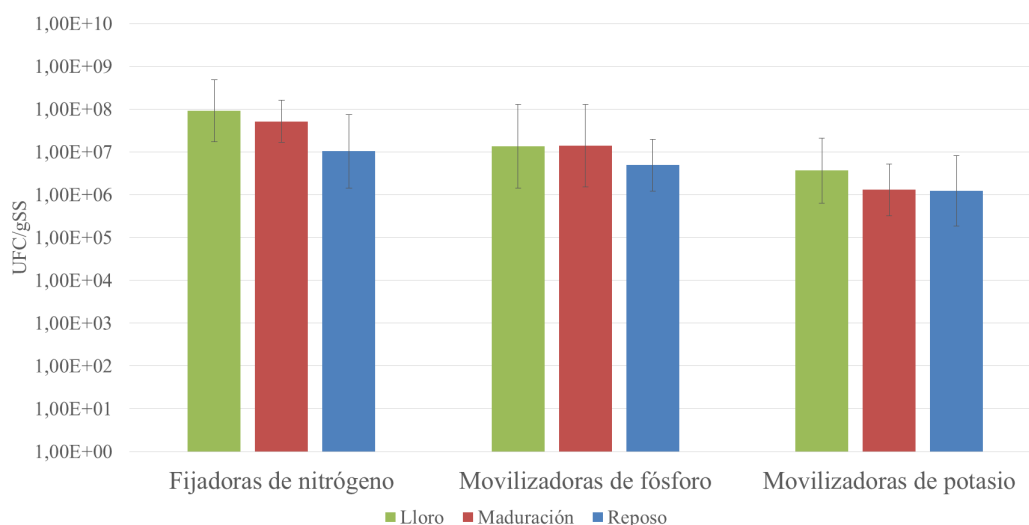
La relación que pudiera existir entre bacterias heterótrofas, levaduras y hongos filamentosos respecto a los estados fisiológicos de la vid (reposo, lloreo y maduración) junto con los diferentes tipos de suelo (ARC, ARN y CAL) se ha analizado mediante ANOVA (*ANalysis Of VAriance*). Los resultados del *test* LSD para la comparación de medias con una confianza del 95,0 % (Figura 7.3) indican que el recuento de bacterias se mantiene constante en relación a los diferentes tipos de suelos (ARC: Arcillosos, ARN: Arenosos y CAL: Calizos) con un p-valor=0,6785. Además la comparación de medias por estado fisiológico muestra grupos no homogéneos (p-valor=0,0001), siendo el estado de lloreo significativamente diferente al de maduración y reposo. El grupo microbiano de las levaduras no se ve afectado en concentración por tipo de suelo (p-valor=0,4179) sin embargo, sí por estado fenológico (p-valor=0,0014), en estado de reposo se observa una concentración de levaduras mayor diferenciándose de lloreo y maduración. En el grupo microbiano de los hongos filamentosos observamos diferencias significativas también en reposo (p-valor=0,0067), mostrando un aumento de concentración respecto a lloreo y maduración. No obstante, los hongos filamentosos no presentan diferencias de concentración por tipo de suelo (p-valor=0,2093).

### 7.1.2. Recuento de microorganismos viables de interés agrícola

Los resultados que se exponen a continuación complementan los anteriores desde un punto de vista centrado en el interés por la fertilidad de los suelos de las parcelas vitícolas estudiadas. Las muestras de suelo se han procesado para el cultivo de microorganismos de interés agrícola en medio sólido y se ha utilizado el método del NMP para obtener el valor del recuento microbiano. Esta metodología se describe en *MATERIAL Y MÉTODOS, Sección 4.4.1*.

Los resultados se han presentado de la misma forma que se expusieron en la sección anterior. En primer lugar los resultados se muestran en función del estado fisiológico de la vid y, posteriormente, por parcelas. Los valores representados corresponden al promedio de las muestras tomadas en este estudio, detalladas en número y localización en la *Sección III*.

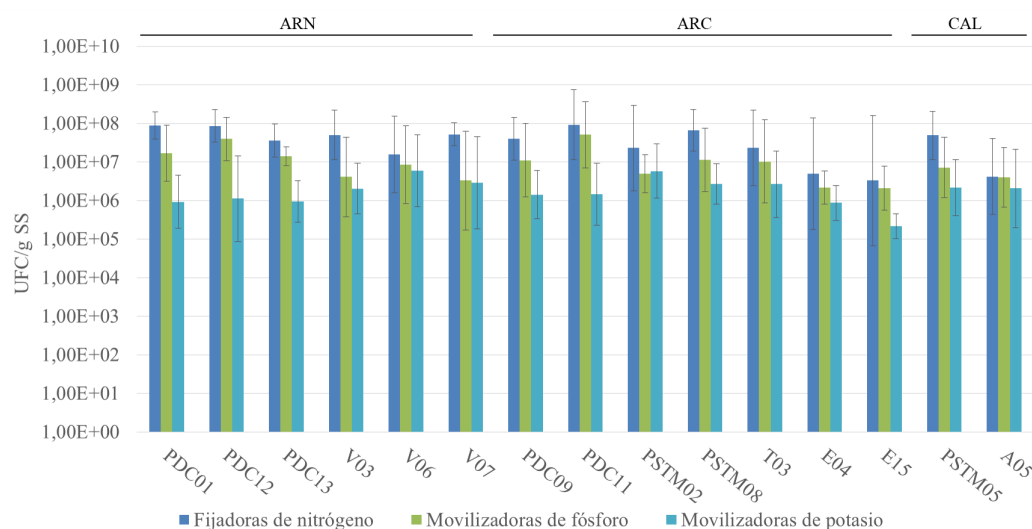
En primer lugar, analizamos los datos de recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno, movilizadoras de fósforo y de potasio. En la Figura 7.4 se puede observar que existen diferencias en concentración (UFC/gSS) de bacterias fijadoras de nitrógeno respecto al estado fisiológico de la vid. En lloreo y maduración se observa una población más abundante que en reposo, estas diferencias se comentarán posteriormente. La concentración máxima de bacterias movili-



**Figura 7.4:** Conteo de bacterias movilizadoras de fósforo y movilizadoras de potasio. Los datos obtenidos, desde el año 2015 y hasta el año 2018, se filtran en base a los tres estado fenológicos de la vid: Reposo ( $n=108$ ), lloro ( $n=72$ ) y maduración ( $n=108$ ) en abscisas. En ordenadas se muestra, en escala logarítmica, la concentración de bacterias en Unidades Formadoras de Colonias en gramos de Suelo Seco.

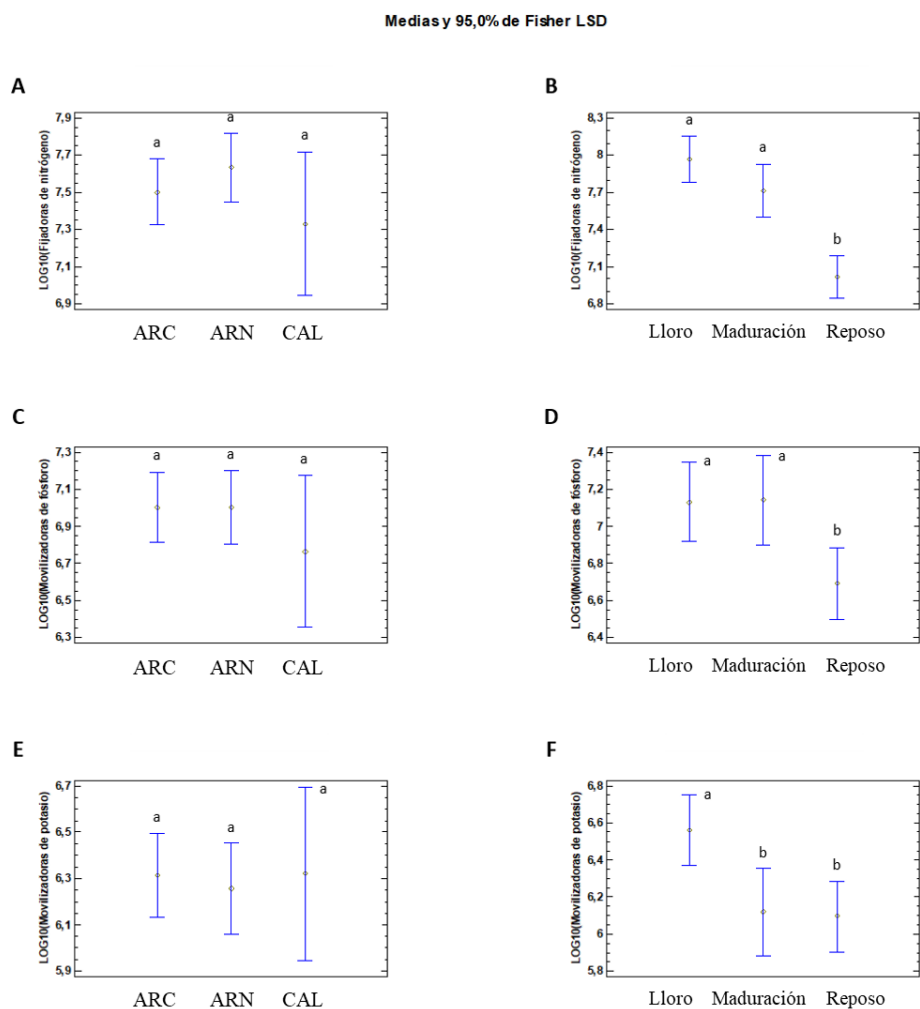
zadoras de fósforo,  $1,16 \cdot 10^8$  UFC/g SS, se observa en el estado fisiológico de lloro siendo similar a la concentración que se obtiene en maduración y diferenciándose del recuento en reposo, en la cual se obtiene la mínima concentración entorno a  $1,00 \cdot 10^7$ . En cuanto a las bacterias movilizadoras de potasio, se observa una concentración cercana a  $5,00 \cdot 10^7$  UFC/gSS en reposo y maduración. Por el contrario, en lloro se alcanza una concentración máxima diferenciándose significativamente de reposo y maduración ( $p\text{-valor}=0,0080$ ). Las diferencias que se pudieran observar en el recuento de estas poblaciones se analizaran posteriormente mediante ANOVA y comparación de medias.

Para determinar cuáles de las parcelas estudiadas se muestran más activas en cuanto a la fijación de nitrógeno, movilización de fósforo y potasio (bacterias NPK) se han representado estos grupos bacterianos funcionales atendiendo a la concentración promedio durante este estudio. En la Figura 7.5 se observa, de forma general, una concentración mayor de bacterias fijadoras de nitrógeno. En concentración decreciente se encuentran las bacterias movilizadoras de fósforo y por último las bacterias movilizadoras de potasio. La parcela PDC01 muestra la tendencia comentada anteriormente y con una desviación típica no muy acusada, lo cual define que las poblaciones bacterianas no sufren mucha varia-



**Figura 7.5:** Recuento de bacterias movilizadoras de fósforo y movilizadoras de potasio. En abscisas se filtran los datos por parcelas muestreadas, desde el año 2015 y hasta el año 2018. En ordenadas se muestra la concentración de bacterias (Unidades Formadoras de Colonias) en gramos de Suelo Seco en escala logarítmica.

ción en este suelo. En la parcela PDC12 destaca una desviación típica grande en el recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno. La parcela PDC13 mantiene el recuento de fijadoras de nitrógeno y movilizadoras de fósforo aunque el recuento de bacterias movilizadoras de potasio, reflejado en una desviación típica grande. V03 muestra un comportamiento poblacional como el indicado de forma general. En la parcela V06 las poblaciones se mantienen estables, al igual que ocurre en V07. Las parcelas descritas anteriormente forman un grupo denominado ARN, son parcelas con tipo de suelo arenoso aunque no se encuentran diferencias con suelos ARC (arcillosos) ni CAL (calizos). Las siguientes parcelas, de las que vamos a detallar las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno, movilizadoras de fósforo y potasio, pertenecer al conglomerado de parcelas ARC o arcillosas. En la parcela PDC09 las bacterias fijadoras de nitrógeno y movilizadoras de fósforo mantienen su concentración en  $1,00 \cdot 10^8$  UFC/g SS mientras que las bacterias movilizadoras de potasio se mantienen en  $5,00 \cdot 10^6$  UFC/gSS. En la parcela A05 se mantienen los recuentos de bacterias NPK entorno a  $1,00 \cdot 10^7$  durante todo el estudio.

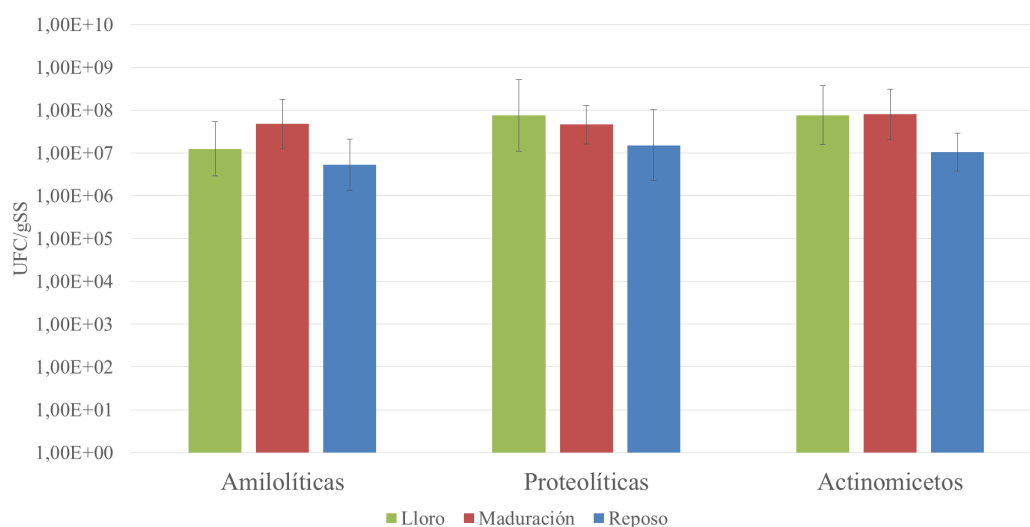


**Figura 7.6:** Test de Fisher LSD para comparación de medias de concentración de bacterias NPK, desde el año 2015 y hasta el año 2018, en relación al tipo de suelo y al estado fisiológico de la vid (lloro, maduración, reposo) con una confianza del 95,0%. **A:** Concentración promedio de bacterias fijadoras de nitrógeno *vs.* tipo de suelo. **B:** Concentración promedio de bacterias fijadoras de nitrógeno *vs.* estado fisiológico de la vid. **C:** Concentración promedio de bacterias movilizadoras de fósforo *vs.* tipo de suelo. **D:** Concentración promedio de bacterias movilizadoras de fósforo *vs.* estado fisiológico de la vid. **E:** Concentración promedio de bacterias movilizadoras de potasio *vs.* tipo de suelo. **F:** Concentración promedio de bacterias movilizadoras de potasio *vs.* estado fisiológico de la vid. **ARC:** Arcillosa, **ARN:** Arenosas, **CAL:** Calizas.

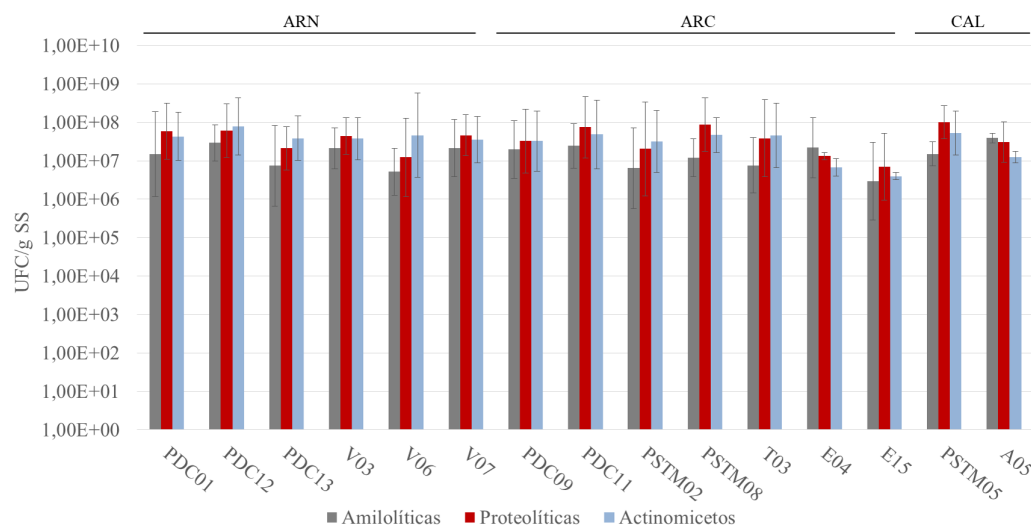
Para verificar si la variación en los recuentos de las poblaciones bacterianas NPK se debe al tipo de suelo o al estado fisiológico de la vid se han comparado las medias del recuento bacteriano mediante el *test* de Fisher LSD. En la Figura 7.6 A se observa que el recuento promedio (UFC/gSS) de bacterias fijadoras de nitrógeno no presenta diferencias por tipo de suelo (p-valor=0,3923). Ahora bien, si observamos Figura 7.6 B podemos observar que esta población bacteriana es más abundante en lloro que en maduración y reposo (p-valor=0,0003). En cuanto a las bacterias movilizadoras de fósforo, podemos apreciar en la Figura 7.6 C y D que no depende su recuento por el tipo de suelo (p-valor=0,6746) pero sí por estado fisiológico de la vid, ya que el recuento promedio en lloro es mayor y diferente al recuento de bacterias movilizadoras de fósforo en el suelo en el estado de reposo (p-valor=0,0364). Este *test* Fisher LSD también se ha realizado para las bacterias movilizadoras de potasio. En la Figura 7.6 E no se observa una variación de recuento por tipo de suelo de esta población (p-valor=0,9494) aunque sí se puede atribuir al estado fisiológico de la vid un aumento de bacterias movilizadoras de potasio en lloro y un descenso en maduración y reposo significativos estadísticamente (p-valor=0,0080).

Otra de las necesidades de un suelo agrícola es el aporte de nitrógeno y de materia orgánica bio-disponible para la vid y la microbiota que actúe como coadyuvante en el proceso de nutrición vegetal. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son las responsables de la fijación de nitrógeno atmosférico en el suelo. Además, las bacterias proteolíticas y amilolíticas fraccionan la materia orgánica, obteniéndose una mayor bio-disponibilidad vegetal de materia carbonada y los actinomicetos permiten la comunicación entre cepas para el flujo de entrada o salida de nutrientes. En la Figura 7.7 se muestran los datos correspondientes al recuento en maduración muestran una concentración de bacterias similar entre los diferentes grupos microbianos. En el estado de lloro se aprecia un aumento de concentración en todos los grupos, exceptuando a las bacterias amilolíticas. En el estado fisiológico de reposo de la vid observamos el menor recuento de bacterias amilolítica entre estados ( $7,55 \cdot 10^7$  UFC/g SS). En cuanto al recuento de bacterias proteolíticas se observa una concentración similar al estado de maduración. En general, el estado de reposo muestra valores de concentración microbiana menores que en maduración y lloro, cuya significación estadística se analizará más adelante.

Atendiendo al recuento por parcelas de las bacterias amilolíticas se obtienen valores de entre  $10^7$ - $10^8$  UFC/g SS (Figura 7.8). Mostrando una menor concentración en la parcela E04, la cual se encontraba sin cultivar en el momento de la toma de muestras. Las bacterias proteolíticas se encuentran en mayor concentración en las parcelas T03 y PSTM08 y en menor concentración en la



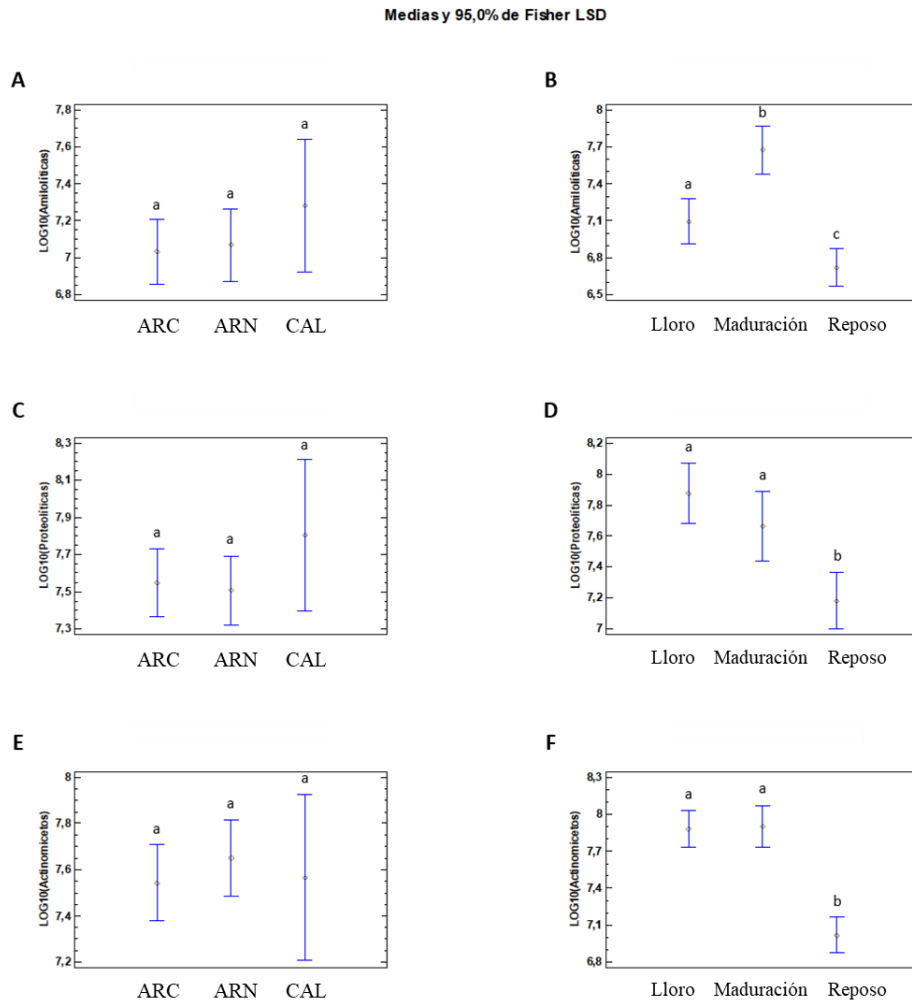
**Figura 7.7:** Recuento mediante NMP de bacterias amilolíticas, proteolíticas, actinomicetos y fijadoras de nitrógeno de las muestras de suelo estudiadas. Los datos obtenidos, desde el año 2015 y hasta el año 2018, se filtran en base a los tres estado fenológicos de la vid: Reposo (n=108), lloro (n=72) y maduración (n=108).



**Figura 7.8:** Recuento mediante NMP de bacterias amilolíticas, proteolíticas, actinomicetos y fijadoras de nitrógeno de las muestras de suelo estudiadas desde el año 2015 y hasta el año 2018. Se muestran los promedios de recuento obtenidos de las diferentes parcelas analizadas. **ARC:** Arcillosa, **ARN:** Arenosas, **CAL:** Calizas.

parcela E15 ( $<10^7$  UFC/g SS). La parcela V06 muestra una mayor concentración de actinomicetos si la comparamos con las demás parcelas. El recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno muestra un máximo en la parcela PDC11. En general, los recuentos no muestran grandes diferencias entre parcelas excepto en las parcelas E04 y E15. Estas parcelas se encuentran muy próximas entre sí (Figura 4.1). La parcela E04, como citábamos con anterioridad, no se encuentra en explotación y en la parcela E15 se encuentra un cultivo de muy temprana edad.

También se ha estudiado la relación que pudiera tener el tipo de suelo o el estado fisiológico de la vid en el momento de recogida de muestras mediante el *test* Fisher LSD. La población de bacterias amilolíticas no presenta diferencias de concentración referente al tipo de suelo (p-valor=0,9242), como se muestra en la Figura 7.9. Pero sí existe una población más abundante en maduración que diferencia a los estados fisiológicos de lloro y reposo (p-valor=0,0073), los cuales presentan menor concentración de bacterias amilolíticas (Figura 7.9 B). Las bacterias proteolíticas tampoco presentan variaciones atribuibles al tipo de suelo (p-valor=0,4284) pero sí se diferencian en cuanto al estado fisiológico de la vid. En la Figura 7.9 D observamos un aumento significativo en la concentración de bacterias proteolíticas en lloro, mientras que en maduración y reposo esta población desciende (p-valor=0,0022). En cuanto a la población de actinomicetos (7.9 E y F), tampoco se observan diferencias por tipo de suelo (p-valor=0,6720) aunque sí por estado fisiológico de la vid. En lloro y maduración se observa una mayor concentración de actinomicetos en el suelo que en reposo (p-valor=0,0001).



**Figura 7.9:** Test de Fisher LSD para comparación de medias de concentración de bacterias amilolíticas, proteolíticas y actinomicetos, desde el año 2015 y hasta el año 2018, en relación al tipo de suelo y al estado fisiológico de la vid (lloro, maduración, reposo) con una confianza del 95,0%. **A:** Concentración promedio de bacterias amilolíticas *vs.* tipo de suelo. **B:** Concentración promedio de bacterias amilolíticas *vs.* estado fisiológico de la vid. **C:** Concentración promedio de bacterias proteolíticas *vs.* tipo de suelo. **D:** Concentración promedio de bacterias proteolíticas *vs.* estado fisiológico de la vid. **E:** Concentración promedio de actinomicetos *vs.* tipo de suelo. **F:** Concentración promedio de actinomicetos *vs.* estado fisiológico de la vid. **ARC:** Arcillosa, **ARN:** Arenosas, **CAL:** Calizas.

### 7.1.3. Capacidad funcional del suelo

Existen muchos factores que condicionan la productividad del suelo, si bien la biomasa microbiana es la que condiciona gran parte de los procesos que involucran la transformación y ciclado de nutrientes, el mantenimiento de la materia orgánica lábil, así como la macro-agregación de materiales que favorecen la retención de agua y la aireación del suelo.

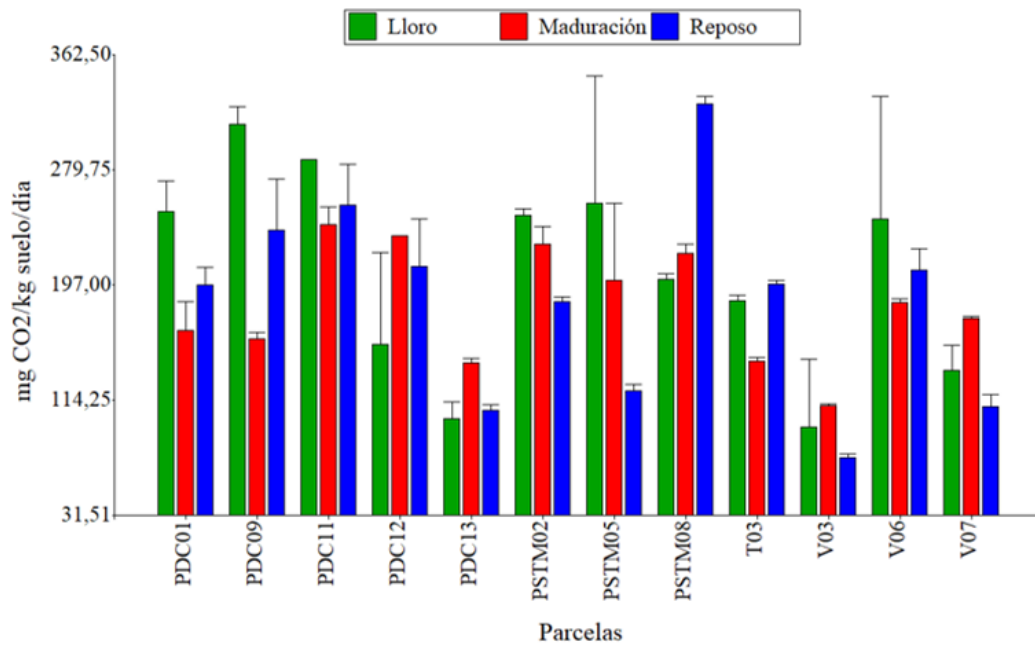
A nivel bioquímico, los parámetros que aportan información más sensible a cualquier cambio en el entorno edáfico son las actividades enzimáticas, consideradas como un fiel reflejo de la fertilidad que presenta un determinado suelo para su explotación agrícola.

#### Medidas de Respiración Inducida por Sustrato (SIR) en los suelos

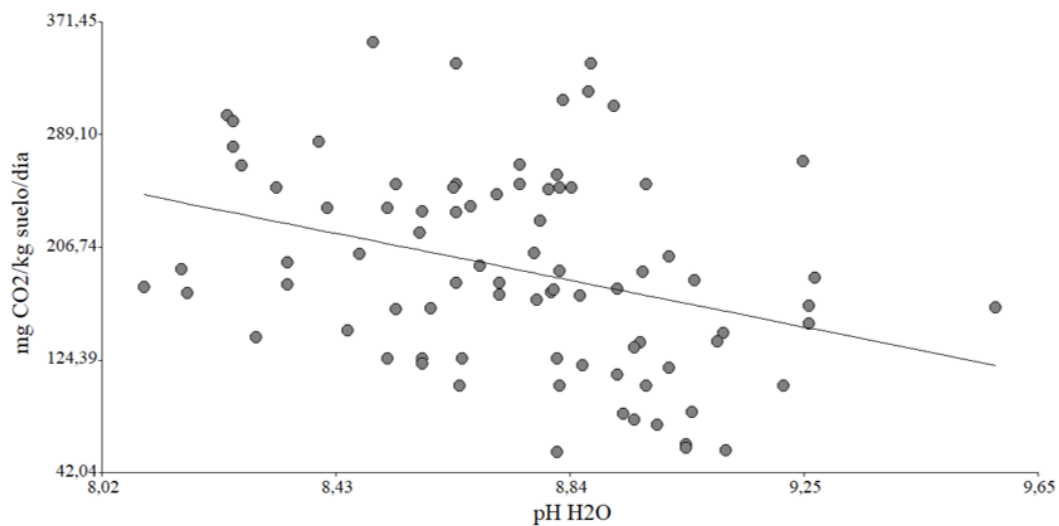
La cuantificación del CO<sub>2</sub> producido por la microbiota aerobia del suelo como resultado de la metabolización de un sustrato respirable, como es la glucosa, permite estimar indirectamente la biomasa contenida en el suelo. En la *Sección 1.2.1* de la *INTRODUCCIÓN* se explica detalladamente el proceso metabólico de la Respiración Inducida por Sustrato (SIR).

Los resultados obtenidos del SIR se muestran organizados por parcelas (pertenecientes al grupo PDC, PSTM, V y T) y, además, por estado fisiológico de la vid (reposo, lloro y maduración), año (2015 y 2016) y tipo de suelo (ARN, ARC y CAL).

En primer lugar vamos a exponer los resultados representados por estado fisiológico de la vid (Figura 7.10). En las parcelas PDC11 y PDC12 no se observan diferencias en las medidas de respiración en los diferentes estados de la vid. La respiración en lloro de las parcelas PDC01 y PDC09 es mayor que en maduración y reposo, un 42 % y 23 % respectivamente. En la parcela PCD01 no existen diferencias entre la respiración analizada en maduración y reposo. Por el contrario, entre reposo y maduración existen diferencias significativas siendo las medidas de  $236,57 \pm 43,27$  mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día y  $157,99 \pm 32,80$  mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día respectivamente. Dentro del grupo de las parcelas PDC la parcela PDC13 es la que menor SIR presenta. Los valores de respiración de la citada parcela se mantienen similares en lloro y reposo (101,18 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día y 106,69 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día), mientras que en maduración esta actividad respiratoria aumenta hasta 140,66 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día, lo que supone un incremento entorno al 24-28 %.



**Figura 7.10:** Respiración Inducida por Sustrato de las parcelas estudiadas, desde el año 2015 y hasta el año 2018, en los diferentes estados fenológicos de la vid: lloro, maduración y reposo. Las barras indican desviación en el promedio.



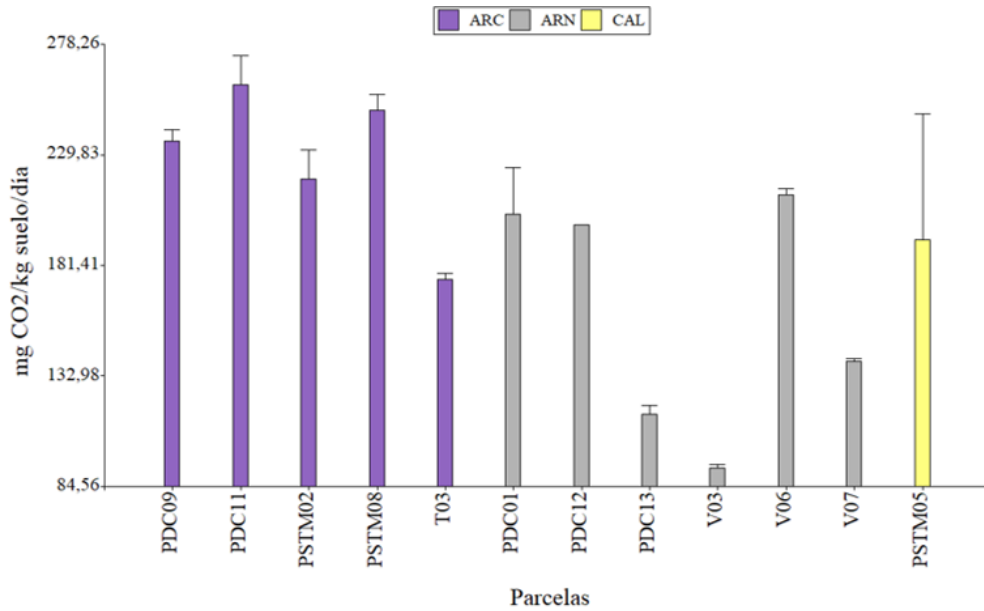
**Figura 7.11:** Representación de la respiración inducida por sustrato frente al pH obtenido de los suelos analizados. El número de muestras de suelo analizadas para esta representación es de 84 (n=84). El p-valor de la regresión lineal es  $<0,001$ , con un ajuste de la recta  $R=0,33$ .

En cuanto a las medidas de respiración en las parcelas PSTM (PSTM02, PSTM05 y PSTM08) se observa un valor similar en lloro y maduración. En las parcelas PSTM02 y PSTM05 la respiración desciende en reposo entorno a 35 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día y 60 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día. En contraste, la parcela PSTM08 aumenta la respiración en reposo, respecto a lloro y maduración, alrededor de 100 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo/día (Figura 7.10).

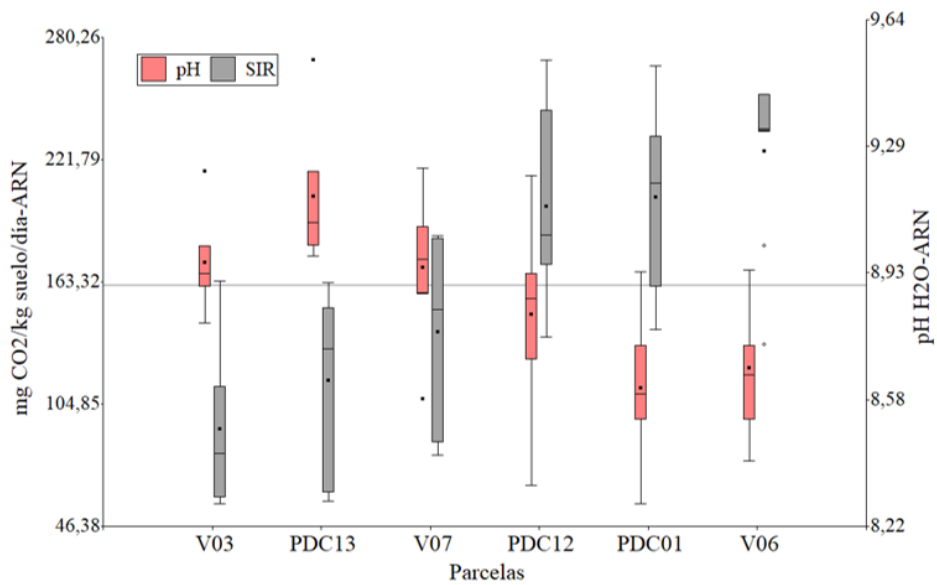
En la *INTRODUCCIÓN* ya se ha comentado la influencia del pH sobre la comunidad microbiana que habita el suelo. Para verificar el efecto de la variación del pH medido en agua (véase *Sección 4.3.2*) sobre la Respiración Inducida por Sustrato se han relacionado estos dos parámetros medidos en los suelos de las parcelas muestreadas (Figura 7.11). La relación del pH sobre el SIR (mg CO<sub>2</sub>/kg suelo·día) resulta negativa según la pendiente de la recta de regresión lineal:  $SIR = -86,53 \cdot pH + 935,10$ . Es decir, a valores crecientes de pH la respiración de la microbiota aerobia del suelo disminuye. En este caso los valores de pH del suelo fluctúan entre 7,84 y 9,58 correspondientes al mínimo y máximo del pH de todas las medidas efectuadas en las parcelas. Y el SIR medido en los suelos estudiados presentan un mínimo de 57,01 y un máximo de 356,47 mg de CO<sub>2</sub>/kg suelo/día.

La respiración de la microbiota del suelo (SIR) presenta diferentes tendencias dependiendo de la textura del suelo. Si analizamos los datos de SIR por parcelas y clasificando por textura, como se muestra en la Figura 7.12, podemos observar una desviación típica más o menos acusada en la respiración (SIR). En las parcelas arcillosas (ARC) no se observa una gran desviación típica del valor de SIR medio. Pero en las parcelas arenosas (ARN) podemos observar fluctuaciones considerables respecto a la media de las medidas de Respiración Inducida por Sustrato. Es decir, la desviación típica de las parcelas ARN es mayor que en el caso de las parcelas ARC.

Anteriormente hemos comentado que el pH afecta de forma negativa a la respiración. A la vista de los datos expuestos en la Figura 7.12 podemos pensar que los suelos arenosos son los que contribuyen, de forma mayoritaria, a esta correlación negativa. Por este motivo, se ha comprobado el efecto pH *vs.* SIR en los suelos arenosos. En la Figura 7.13 podemos observar que la tendencia a valores crecientes de pH es negativa para los valores de Respiración Inducida por Sustrato. Es decir, a valores mayores de pH la medida del SIR decrece. Si realizamos un ajuste lineal por mínimos cuadrados de estas variables en las parcelas ARN (Figura 7.13) determinamos que el modelo se ajusta a los datos con una  $R=0,37$ . Siendo la ecuación de la recta, con pendiente negativa,  $SIR = -86,53 \cdot pH + 935,10$  mg CO<sub>2</sub>/kg suelo·día.



**Figura 7.12:** Respiración Inducida por Sustrato del suelo de las parcelas PDC, PSTM, T y V clasificadas según la textura del suelo ARC (Arcillosas), ARN (Arenosas) y CAL (Calizas) desde el año 2015 y hasta el año 2018.

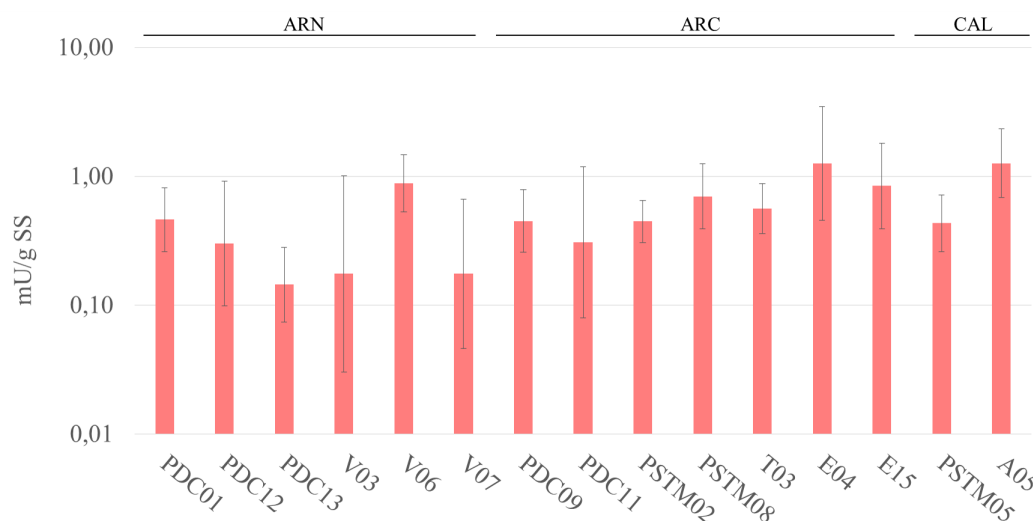


**Figura 7.13:** Promedios de pH  $\pm$  desviación *versus* SIR en mg de CO<sub>2</sub>/ kg de suelo y día  $\pm$  desviación de las parcelas arenosas.

Se ha realizado una comparación de medias de SIR a pH mayor y menor a 8,9 debido a que se observan dos bloques muy bien diferenciados en la respiración del suelo. A pH con un valor superior a 8,9 la respiración se reduce considerablemente comparado con suelos cuyo pH es menor a 8,9. Este comportamiento de respiratorio en relación al pH de la microbiota edáfica se observa fácilmente en suelos arenosos Figura 7.13. Las parcelas V03, PDC13 y V07 tienen un pH menor a 8,9 y el SIR es superior que en las parcelas PDC12, PDC01 y V06, las cuales presentan un pH superior a 8,9.

### Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa

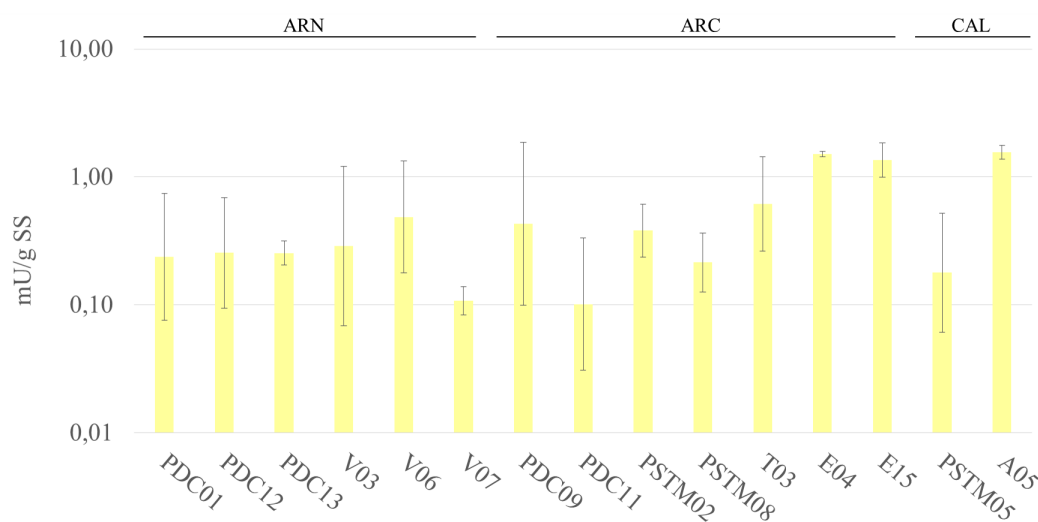
Las medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa promedio fluctúan entre  $1,65 \pm 1,17$  mU/gSS (en la parcela E04) y  $0,15 \pm 0,13$  mU/gSS (en PDC13). En general, los niveles de esta enzima se mantienen bajos entorno a 0,59 mU/gSS en promedio incluyendo todas las parcelas analizadas. Destacan las parcelas A05 y E04 con una actividad  $\beta$ -galactosidasa elevada, en A05 la medida es  $1,43 \pm 0,85$  mU/gSS. La variación en las medidas promedio es amplia debido a que los valores de esta actividad se mantiene en niveles bajos (Figura 7.14).



**Figura 7.14:** Actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa promedio del suelo en las 15 parcelas estudiadas desde el año 2015 y hasta el año 2018. Las barras representadas indican la desviación de las medidas efectuadas.

### Determinación de la actividad deshidrogenasa

La medida de la actividad enzimática deshidrogenasa permite cuantificar la actividad microbiana de un determinado suelo. Por tanto, podemos definir este parámetro como un indicador indirecto de la actividad que se desarrolla en el suelo desde el punto de vista microbiano. Los resultados obtenidos en las medidas de la actividad deshidrogenasa se muestran en la Figura 7.15 los valores promedio de  $0,53 \pm 0,51$  mU/gSS. El máximo de esta actividad se ha medido en la parcela A05 con un valor de  $1,56 \pm 0,05$  mU/gSS y un mínimo detectado en las parcelas V07 y PDC11 con valores de  $0,11 \pm 0,11$  y  $0,10 \pm 0,52$  mU/gSS.



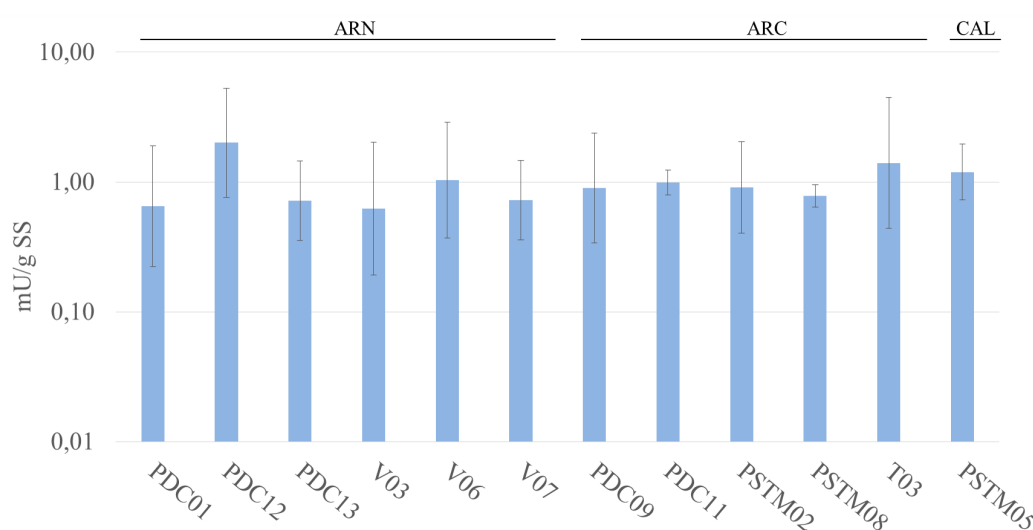
**Figura 7.15:** Actividad enzimática deshidrogenasa promedio del suelo en las 15 parcelas estudiadas desde el año 2015 y hasta el año 2018. Las barras representadas indican la desviación de las medidas efectuadas.

### Determinación de la actividad proteasa

La actividad proteasa del suelo es la responsable de la descomposición progresiva del nitrógeno contenido en las proteínas y su transformación a aminoácidos. Las enzimas del suelo que catalizan esta actividad provienen de la mayoría de los microorganismos contenidos en él, también de residuos vegetales y de su microfauna. Por tanto, puede considerarse una actividad indicadora del buen estado del suelo.

En la Figura 7.16 se muestran las medidas de actividad proteasa promedio de cada parcela. En general los valores observados se mantienen estables en

promedio, entre 0,5-1 mU/gSS. Se observa una actividad máxima en la parcela PDC12 de  $6,93 \pm 0,03$  mU/g SS. La segunda parcela que presenta un máximo de actividad a lo largo del estudio es la parcela T03 ( $6,45 \pm 0,04$  mU/g SS). Ambas parcelas tienen una pendiente de 27 y de 17 en % de desnivel, respectivamente. Aunque T03 se trabaja en terrazas o escalones, y por este motivo la pendiente desciende respecto de PDC12, la cual se encuentra en ladera sin modificar (Figura 4.1). La actividad proteasa podría estar relacionada positivamente con la pendiente de la parcela, aunque en las otras actividades enzimáticas analizadas no se observa esta relación.



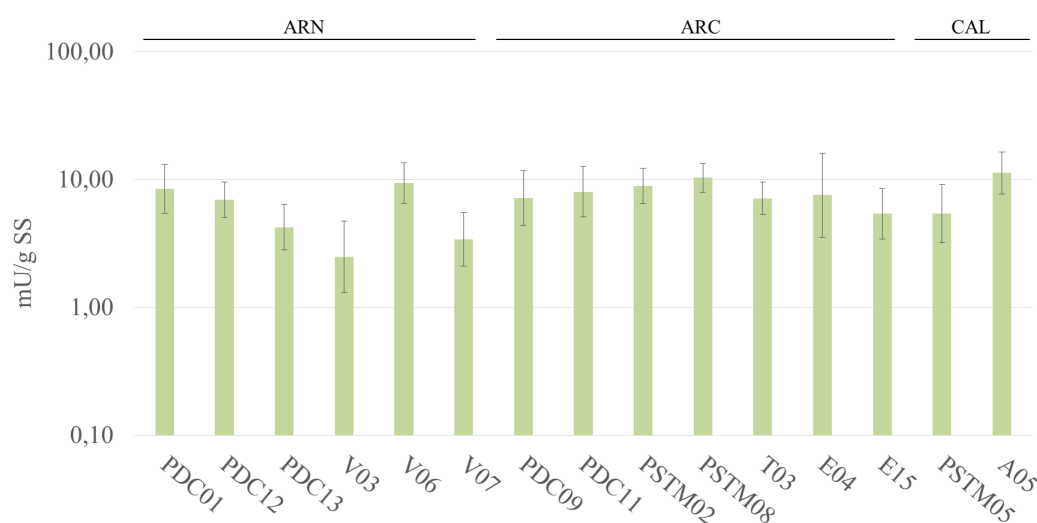
**Figura 7.16:** Medidas promedio por parcela de actividad enzimática proteasa desde el año 2015 y hasta el año 2018. Las unidades en las que se mide esta actividad son mU/gSS, mili-Unidades en gramo de Suelo Seco.

### Determinación de la actividad fosfomonoesterasa alcalina

Como hemos visto anteriormente, el pH del suelo de las parcelas estudiadas es alcalino incluso se supera en valor de 9,00. Debido a las características electroquímicas de los suelos estudiados, el análisis de la fosfomonoesterasas ácidas no ha lugar y, por tanto, los análisis enzimáticos efectuados se han centrado en las fosfomonoesterasas alcalinas.

Las medidas de actividad enzimática fosfomonoesterasa alcalina o fosfatasa alcalina muestran una actividad elevada de forma general aunque la desviación típica difiere entre parcelas. El suelo de las parcelas como la A05 ( $11,86 \pm 4,86$  mU/gSS) y la parcela PSTM08 ( $10,67 \pm 2,98$  mU/gSS) muestran valores de

fosfatasa alcalina elevados. Se observan parcelas cercanas geográficamente a la parcela PSTM08, como son las pertenecientes a la zona de Vallejos (V03, V06 y V07), que presentan diferencias en la desviación típica de actividad enzimática comparada con esta parcela PSTM08. Es decir, aunque se sitúan contiguas la actividad enzimática y la desviación típica varía. Las parcelas V03 y V07 tienen una actividad de  $2,92 \pm 1,66$  y  $3,71 \pm 1,56$  mU/gSS en promedio mientras que la parcela V06 mantiene un valor de  $9,90 \pm 3,25$  mU/gSS.



**Figura 7.17:** Medidas de la enzima fosfomocsterasa alcalina en los suelos de las parcelas analizadas desde el año 2015 y hasta el año 2018. Las unidades de actividad enzimática se expresan en mU/gSS (mili-Unidades/g de Suelo Seco).

## 7.2. Discusión

La relación que pudiera existir entre los diferentes grupos bacterianos, hongos filamentosos y levaduras respecto a los estados fisiológicos de la vida (lloro, maduración, reposo) junto con los diferentes tipos de suelo (ARN, ARC y CAL) se ha analizado mediante MANOVA (*Multivariate ANalysis Of VAriance*).

Los resultados de los *tests* de Fisher LSD indican que el recuento de bacterias heterótrofas aumenta en el estado de lloro de forma significativa (Figura 7.3). Este aumento se produciría por un aumento de temperatura y humedad del suelo mediado por factores ambientales típicos de la estación de primavera. Al contrario de lo ocurrido con los recuentos de bacterias heterótrofas, los hongos filamentosos y levaduras aumentan su concentración (UFC/gSS) en

reposito respecto a maduración y lloro, posiblemente por la resistencia a bajas temperaturas gracias a la pared celular de quitina y la producción de solutos anticongelantes como glicerol mediados por proteínas CSP (*Cold Shock Protein*) los cuales mantienen la viabilidad y la integridad celular (Al-Fageeh & Smales, 2006). En cuanto al recuento de las bacterias NPK (Figura 7.6), se observa un aumento de concentración de bacterias fijadoras de nitrógeno y movilizadoras de fósforo en lloro y maduración, disminuyendo de forma significativa en reposo. Este marcado comportamiento estacional se debe a factores climáticos como la temperatura (Schostag *et al.*, 2015) o bien es posible que la vid informe de los requerimientos nutricionales mediante señales químicas a la microbiota edáfica asociada. Las bacterias movilizadoras de potasio (KSB) aumentan en concentración en el estado de lloro de forma significativa. Este incremento notable de KSB promueve la generación de fitohormonas (Jha & Subramanian, 2016) que señalizan la producción anual de hojas y frutos. La concentración de bacterias amilolíticas aumenta de forma gradual desde lloro hasta maduración. En este lapso de tiempo se realiza la poda en verde y desnieto de la vid para facilitar la aireación de la planta y evitar la aparición de hongos en madera y racimo. Esta práctica y los restos de poda que caen al suelo aumentan la materia orgánica estimulando la actividad biológica y aumentando la productividad de este (Crovetto, 1996, 2002). Esta práctica agrícola promueve el aumento de la población de bacterias amilolíticas debido a un aumento de almidón en el suelo. Este almidón procede de cloroplastos amilíferos de la hoja y en la baya de *Vitis vinifera* durante el envero. Posteriormente el almidón se moviliza durante la etapa de maduración desde las bayas a las hojas (Fougère-Rifot *et al.*, 1995). O a través de poblaciones microbianas intermedias en el proceso que degradan la lignina en polisacáridos menos ramificados y más accesible para esta población de bacterias amilolíticas. Este proceso degradativo se vería limitado a la presencia de agua por factores ambientales debido a que el riego por goteo únicamente provee de agua el pie de la vid y, recordemos que, la muestra se ha tomado en la zona intermedia entre líneas productivas. Las bacterias proteolíticas y actinomicetos disminuyen en concentración en el estado de reposo. Los hongos filamentosos y las levaduras aumentan en recuento (UFC/gSS) durante el estado de reposo (Figura 7.3 F) y en lloro y maduración se mantienen en niveles más bajos, este efecto estacional no ocurre en otros viñedos donde la población de hongos filamentosos se mantiene estable (Corneo *et al.*, 2013). Según López-Piñeiro *et al.* (2013) el incremento de la población de levaduras en el suelo depende de los azúcares fermentables que están disponibles en el mismo durante los 3 meses después de la vendimia y por la actividad humana en el viñedo. También es posible que las levaduras habiten el suelo durante el invierno y debido a agentes atmosféricos como lluvia o viento puedan desplazarse hacia la parte aérea de la vid. Para explicar esta hipótesis podemos pensar

en que al caer una gota de agua al suelo la salpicadura provocada proyecta un inoculo acuoso con levaduras hacia la madera de la vid. En principio este suceso es probable y se podría aplicar a la movilización de hongos filamentosos patógenos como vía infectiva hacia la madera.

En cuanto a las medidas de actividad enzimática, la fosfatasa alcalina muestra valores diferentes en las parcelas pertenecientes a Vallejos (V03, V06 y V07). Aunque estas parcelas se sitúan contiguas, los valores de actividad en V03 y V07 son notablemente menores que en la parcela V06. El pH se mantiene en promedio similar en las tres parcelas (8,73; 8,70; 8,67). Esto puede deberse a al porcentaje de caliza total en el suelo de estas parcelas. El ión  $\text{Ca}^{2+}$  reduce la actividad fosfatasa alcalina en algunos microorganismos como, por ejemplo, del género *Aspergillus* (Sakurai *et al.*, 1981) pudiendo ocurrir el mismo suceso en otros hongos filamentosos. En las parcelas V03 y V07 se ha medido una cantidad de calcio de 7,10 mg y 6,18 mg, respectivamente, en la parcela V06 el calcio medido es de 9,01 mg. Por tanto, es posible una reducción de la actividad fosfatasa debido a la concentración de calcio, aunque se debería complementar con el análisis de más muestras para verificar este efecto.

La respiración inducida por sustrato muestra valores reducidos en el caso de las parcelas arenosas (ARN) PDC13, V03 y V07. Las parcelas V03 y V07 además de presentar un SIR menor también presentan una capacidad de retención hídrica o agua disponible menor que el resto de las parcelas ARN. Los porcentajes de arena gruesa en V03 y V07 son del 15,3 y 11,20 %, respectivamente. Mientras que el resto de parcelas arenosas ronda el 8 % de arena. La respiración disminuye a porcentajes crecientes de arena. Es posible esperar que una relación superficie/volumen menor permite una adhesión de microorganismos más baja y, por tanto, una menor respiración microbiana. Los resultados obtenidos muestran un aumento de respiración en suelos arcillosos (Figura 7.12) difieren con los trabajos de Wang *et al.* (2003) y Franzluebbbers (1999) en los cuales existe anti-correlación entre SIR y contenido de arcilla en el suelo.

## 8. DIVERSIDAD MICROBIANA NO-CULTIVABLE EN SUELOS VITÍCOLAS Y MADERA DE VID

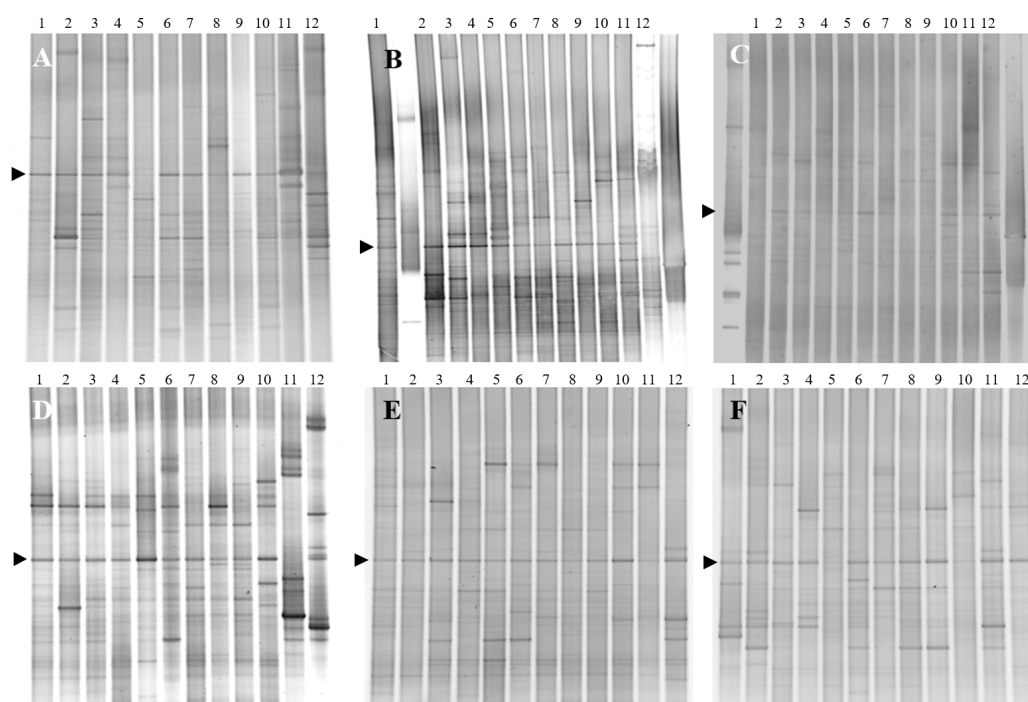
### 8.1. Resultados

En este capítulo se exponen los datos de diversidad bacteriana presente en las muestras de suelo objeto de estudio. Los resultados se muestran por parcelas y estado fisiológico de la vid (reposo, lloro y maduración). La diversidad bacteriana de las muestras de suelo se ha estudiado utilizando técnicas independientes de cultivo basadas en el análisis genético. Al inicio de este estudio, se utilizó la técnica de PCR-DGGE como procedimiento aproximado para el conocimiento de la biodiversidad bacteriana del suelo, detallada en la sección *MATERIAL Y MÉTODOS (III)*. Posteriormente se optó por analizar la microbiota de los suelos mediante secuenciación masiva de hongos filamentosos y bacterias porque se tuvo acceso a esta técnica y permitían obtener un mayor volumen de datos de las poblaciones microbianas.

#### 8.1.1. Estudio de la diversidad de las poblaciones bacterianas mediante DGGE

En este trabajo hemos realizado los análisis meta-taxonómicos de los suelos de las 12 parcelas vitícolas en 6 tomas de muestras desde el invierno de 2014 hasta el verano de 2016. La periodicidad de la recogida de las muestras de suelo se realizó en función de los diferentes estados fisiológicos de la vid: reposo, lloro y maduración. Por tanto, se han procesado 72 muestras de suelo, analizadas mediante técnicas moleculares y resueltas en geles de poliacrilamida en gradiente desnaturante de urea/formamida (Sección 4.1). El análisis de cada gel permite estimar la biodiversidad y, por tanto, la riqueza de los suelos

estudiados mediante el índice de Shannon-Wiener y la comparación de las poblaciones entre parcelas en un estado fisiológico de recogida de muestras en concreto. En todos los análisis se ha observado una posible población constante en todas las muestras de suelo analizadas, como puede apreciarse en la Figura 8.1. La banda señalada con una flecha (►) puede representar una especie bacteriana o un grupo de especies cosmopolita en suelos, aunque mediante esta técnica no es posible identificar la especie, únicamente detectar su presencia. Por tanto, en base a los resultados obtenidos, únicamente podemos visualizar diferencias entre perfiles poblacionales en un mismo gel y calcular el índice de bio-diversidad del suelo de cada parcela por comparación de perfiles de cada banda.



**Figura 8.1:** Geles DGGE de las amplificaciones de ADN bacteriano de los 12 suelos estudiados. Los geles corresponden a un recogida de muestras correspondiente a los siguientes estados fenológicos de la vid y al año: **A:** Reposo 2014, **B:** Lloro 2015, **C:** Maduración 2015, **D:** Reposo 2015, **E:** Lloro 2016, **F:** Maduración 2016. Los suelos pertenecen a las siguientes parcelas identificadas (de izquierda a derecha); 1: PDC01, 2: PDC09, 3: PDC11; 4: PDC12, 5: PDC13, 6: PSTM02, 7: PSTM05, 8: PSTM08, 9: T03, 10: V03, 11: V06, 12: V07.

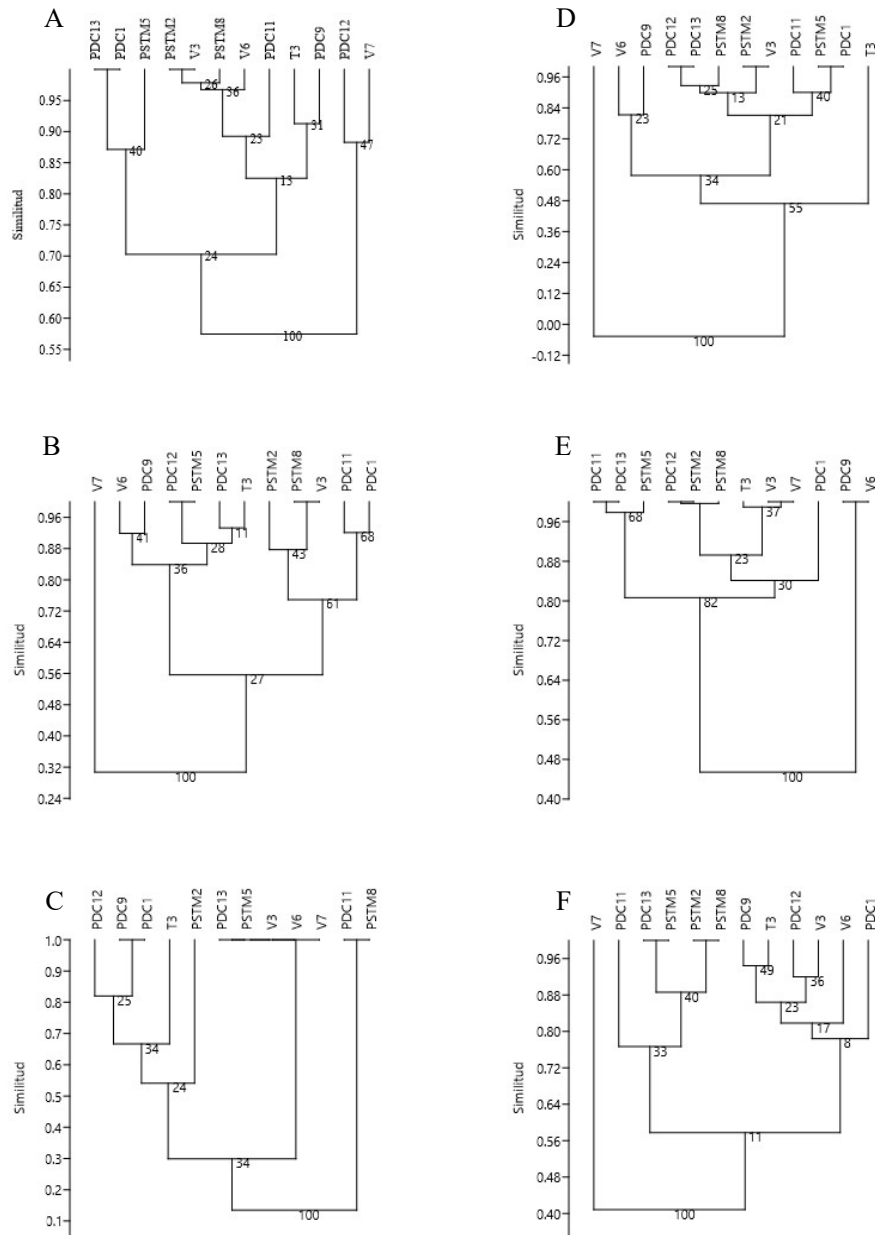
El análisis de similitud de la población bacteriana de cada muestra de suelo

se ha realizado mediante la aplicación de el coeficiente de correlación Rho de Spearman. Para establecer la correlación por similitud de las diferentes poblaciones bacteriana se han utilizado los datos de intensidad de las bandas y la posición en el gel DGGE de estas (Figura 8.1). Los árboles de similitud se han generado mediante el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). En el estado fisiológico de reposo las poblaciones bacterianas del suelo muestran una distribución similar entre las parcelas PSTM2, V3 y PSTM8. Estas parcelas se muestran en un grupo diferenciado en reposo de los años 2014 y 2015 (Figura 8.2 A, D). Además se observa un perfil de distribución poblacional bacteriana similar, debido posiblemente a que estas parcelas se encuentran situadas contiguas espacialmente. En el caso de 2015 la similitud inter-parcelaria es menor, estableciendo el segundo grupo de diversidad con un índice de similitud de 0,56 mientras que en 2014 es de 0,70 (Figura 8.2).

En la Figura 8.2 B se puede apreciar que la diversidad bacteriana en fase de lloreo de 2015 permite la distribución de parcelas en dos grandes grupos. El primero de ellos compuesto por las parcelas V6, PDC9, PDC12, PSTM5, PDC13 y T3. En el segundo grupo donde se incluyen las parcelas PSTM2, PSTM8, V3, PDC11 y PDC1. A diferencia del estado de lloreo de 2015, en lloreo de 2016 las parcelas presentan índices de diversidad bacteriana muy similares: el valor de similitud en el cual divergen las parcelas PDC9 y V6 es de 0,80. Esta divergencia permite diferenciar las citadas parcelas del gran grupo formado por el resto de las parcelas analizadas. (Figura 8.2 E).

En el estado de maduración de 2015 (Figura 8.2 C) las parcelas PDC13, PSTM5 y la zona de Vallejos (V3, V6 y V7) presentan un índice de similitud Rho de 1,0, indicando que los perfiles de diversidad bacteriana de estas parcelas detectada mediante DGGE es similar. Las parcelas restantes se subdividen en grupos en cascada sin definir un *cluster* concreto, sin ninguna agrupación determinada. En maduración del año 2016 (Figura 8.2 F) se distinguen dos grupos de parcelas muy diferenciados: La parcela fuera de grupo es V7 y se observan dos grupos formados por las parcelas PDC11, PDC13, PSTM5, PSTM2 y PSTM8. Y en otro grupo diferenciado se encuentran las parcelas PDC9, T3, PDC12, V3, V6 y PDC1.

La parcela V7 se encuentra fuera de grupo en reposo de 2014-2015, lloreo de 2015 y en maduración de 2016.



**Figura 8.2:** Índices de similitud analizados mediante agrupamiento en árbol mediante el algoritmo UPGMA. Se ha usado el índice de similitud  $Rho$  con un bootstrap de 1000 repeticiones. Cada sub-figura representa una recogida de muestras de suelo en un determinado estado fisiológico de la vid (lloro, maduración, reposo), indicando el año. **A:** Reposo 2014, **B:** Lloro 2015, **C:** Maduración 2015, **D:** Reposo 2015, **E:** Lloro 2016, **F:** Maduración 2016.

**Tabla 8.1:** Índices de Shannon-Wiener y riqueza de especies de las parcelas estudiadas en los estados fenológicos de reposo (**R**), lloro (**LL**) y maduración (**M**) durante los años 2014 (**14**), 2015 (**15**) y 2016 (**16**). En cada análisis se ha determinado la Riqueza o número de bandas (**R**) y el Índice de Shannon-Wiener (**H**).

		PDC01	PDC09	PDC11	PDC12	PDC13	PSTM02	PSTM05	PSTM08	T03	V03	V06	V07
<b>R14</b>	R	15	11	13	10	14	11	14	12	11	12	12	9
	H	2,12	1,95	2,35	1,99	2,41	2,04	2,40	2,32	1,88	2,28	2,03	2,00
<b>LL15</b>	R	18	13	19	11	10	17	11	16	11	16	12	9
	H	2,67	2,30	2,53	2,13	2,12	2,71	2,25	2,57	2,08	2,63	2,39	1,88
<b>M15</b>	R	4	4	2	5	9	3	9	2	5	9	9	9
	H	1,36	1,34	0,68	1,24	1,75	0,92	1,99	0,60	1,00	1,61	1,70	1,73
<b>R15</b>	R	14	9	15	12	12	13	14	11	19	13	11	6
	H	2,27	1,83	2,27	2,19	1,92	2,23	2,39	2,14	2,66	2,26	2,16	1,72
<b>LL16</b>	R	15	8	12	14	12	14	12	14	13	13	8	13
	H	2,59	1,92	2,19	2,41	2,22	2,36	2,30	2,53	2,28	2,17	1,87	2,15
<b>M16</b>	R	8	10	15	9	12	13	12	13	10	9	11	7
	H	1,89	2,04	2,39	1,89	2,33	2,28	2,32	2,18	1,81	1,97	2,10	1,54

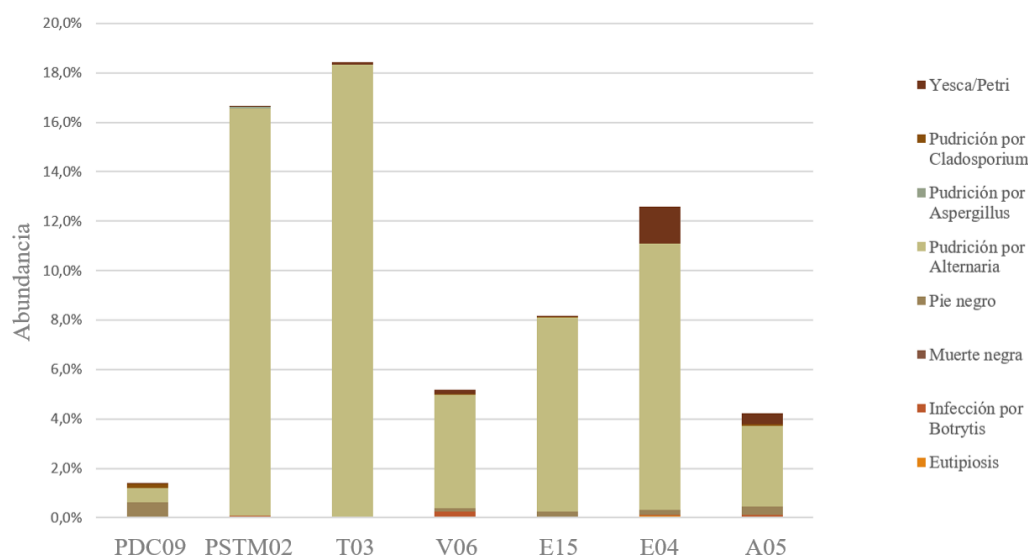
### 8.1.2. Estudio meta-taxonómico de las muestras de suelo y de la madera de la vid. Secuenciación masiva de la región V3 (16S) bacteriana e ITS (26S) en hongos filamentosos.

El estudio del suelo y de la madera de la vid mediante secuenciación masiva de la región 16S en bacterias e ITS en hongos filamentosos permite identificar las principales enfermedades de la madera de la vid como son la Yesca o enfermedad de Petri (dependiendo de si la planta es adulta o joven), la pudrición por *Cladosporium*, *Aspergillus* o *Alternaria*, el pie negro, la muerte negra, infección por *Botrytis* y Eutipiosis. Los datos crudos de los análisis de secuenciación masiva se encuentran disponibles en el servidor del NCBI con el número de acceso: [BioProject ID PRJNA609917](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/609917).

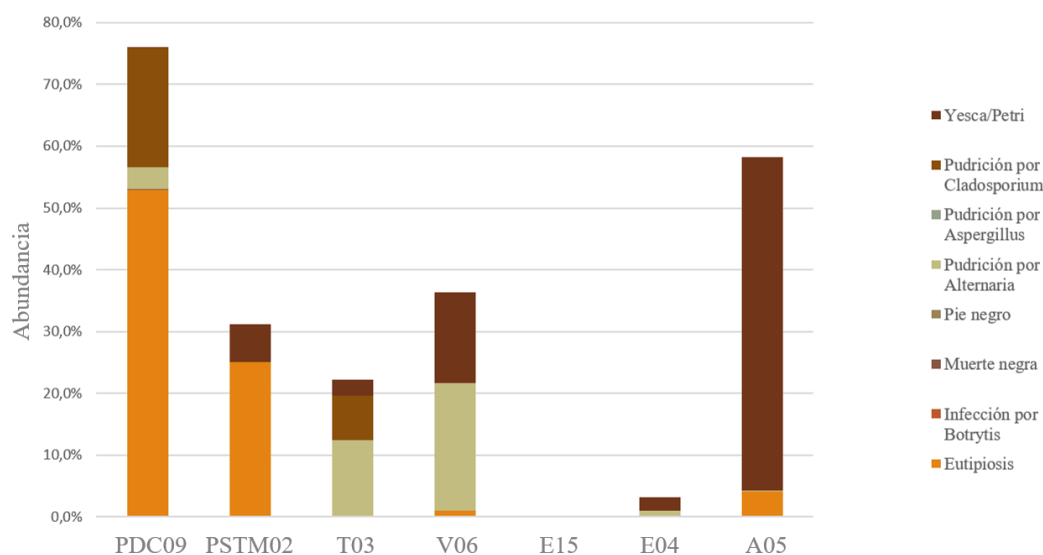
La prevalencia de hongos fitopatógenos de la vid en el suelo se encuentra representada en su mayoría por el género *Alternaria*. Como se comentó en la introducción, este género es ubicuo pero podría presentar capacidad infectiva en la madera de la vid de forma secundaria u oportunista. En todas las parcelas se puede observar que especies del género *Alternaria* presentan una abundancia entre el 18 % como máximo en la parcela T03 y el 0,5 % en la parcela PDC09 del total de lecturas efectuadas mediante secuenciación (Figura 8.3). Se observa también que los hongos filamentosos que producen la enfermedad de la Yesca se encuentran presentes en las muestras de suelo de todas las parcelas, siendo la parcela E04 la que presenta un mayor porcentaje. En la parcela V06 se detecta la presencia de especies del género *Eutypa* con un porcentaje del 0,2 %. La enfermedad del pie negro se identifica en los suelos de las parcelas PDC09, A05, E15 y E04 en orden decreciente de porcentaje.

Una vez analizadas las muestras de madera de vid de las distintas parcelas, observamos que los signos patológicos en la parcela PDC09 se corresponden a Eutipiosis y Yesca con una incidencia del 51 % y del 17 %, respectivamente. En PSTM02 el porcentaje detectado de Eutipiosis es inferior (25 %), igual que ocurre con la Yesca, con un porcentaje del 5 %. En la parcela T03 se detecta en madera Yesca, pudrición por *Cladosporium* y pudrición por *Alternaria*, con un porcentaje de total de patógenos del 21 %. En el caso de la parcela E04 sólo se detectan hongos fitopatógenos participantes en la infección por Yesca y pudrición por *Alternaria* que no llegan al 0,3 % de lecturas totales. Hasta un 59 % de las lecturas de madera en A05 corresponden a microorganismos patógenos, representando más de un 55 % del consorcio de hongos fitopatógenos que producen la enfermedad de la Yesca (Figura 8.4.)

En el suelo el porcentaje de lecturas de hongos patógenos de la madera de la vid no supera el 20 % mientras que en madera con signos patológicos se encuentra por encima de este valor, excluyendo la parcela E04. El género *Eutypa* no se detecta en suelo mientras que en madera si que se detecta su acción invasiva, de forma macroscópica y confirmada mediante análisis metataxonómico. En contraste a la detección en suelo-madera de *Eutypa* y Yesca se detecta en el suelo en todas las parcelas y también se detecta en madera aunque la prevalencia no sea muy alta, como en el caso de la madera de E04.



**Figura 8.3:** Abundancia en suelo de las principales enfermedades de la madera de la vid. En ordenadas se muestra el porcentaje de secuencias sobre el total de lecturas.



**Figura 8.4:** Abundancia de hongos fitopatógenos en madera de vid con lesiones macroscópicas. La parcela E15 no se encuentra en explotación. En ordenadas se muestra el porcentaje de secuencias sobre el total de lecturas.

## 8.2. Discusión

La extracción de ADN de los organismos de un suelo es el primer paso para estudiar la comunidad microbiana del mismo de forma indirecta. Se debe tener en cuenta que en el suelo habitan microorganismos que generan formas de resistencia, que son difícilmente accesibles a la hora de extraer el ADN. Esta situación se da en sistemas monocultivo (Corneo *et al.*, 2013) y también se han descrito suelos vitícolas donde el ADN total aislado del suelo disminuye significativamente (Dequiedt *et al.*, 2011). Las técnicas usadas para calcular la diversidad bacteriana de los suelos estudiados se basan en la amplificación del material genético mediante técnicas de PCR, tanto en la PCR-DGGE como en la amplificación masiva de genes concretos. Esta amplificación se supone homogénea para todos los fragmentos de ADN de la región V4 pero es posible que en algunos la afinidad de la polimerasa sea mayor o menor, sobrestimando o subestimando la población bacteriana (Kircher & Kelso, 2010). Por tanto, estas dos técnicas citadas son comparables si nos basamos en una amplificación previa del material genético. Aunque, en cualquier caso, tanto la PCR-DGGE como la técnica meta-taxonomica permite el cálculo del índice de Shannon o diversidad alfa ( $\alpha$ ), a partir de poblaciones bacterianas totales, es decir cultivables y no cultivables. El control de la biodiversidad de un suelo permite mantener al cultivo libre de enfermedades ya que una comunidad microbiana edáfica deprimida o con baja diversidad facilitaría el desarrollo de enfermedades en la vid (Corti *et al.*, 2007).

La biodiversidad microbiana de un determinado suelo agrícola podría relacionarse de forma directamente proporcional con su capacidad metabólica para degradar las enmiendas aplicadas y mineralizarlas en el sustrato (Montiel-Rozas *et al.*, 2018). Aunque en determinados nichos como el entorno vitícola, un aumento de biodiversidad bacteriana no implicaría una diversidad funcional mayor. Esto es debido a que un determinado consocio microbiano puede aumentar en número de efectivos de diferentes especies pero manteniendo una actividad metabólica redundante (Allison & Martiny, 2008; Bardgett & Van Der Putten, 2014) que serviría para la mineralización de un tipo de sustrato concreto. Existe una suposición general que indica que cuanto mayor es la heterogeneidad ambiental mayor es la diversidad de los organismos complejos, lo cual indica que los hábitats más heterogéneos suelen presentar una mayor diversidad de especies (Heino *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar del reconocido papel central de las bacterias en la fertilidad de los suelos, se ha informado de un menor conocimiento del vínculo entre la heterogeneidad ambiental y la diversidad bacteriana (Dickens *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2015). En varias investigaciones se ha confirmado que las modificaciones de los

parámetros ambientales y fisicoquímicos suelen tender a modificar de manera sustancial la composición de su comunidad bacteriana (Horner-Devine *et al.*, 2004; Ranjard *et al.*, 2013), lo que sugiere una heterogeneidad mediada por factores abióticos. Aunque la relación entre los entornos del suelo y la diversidad fúngica es menos conocida (Peay *et al.*, 2013), algunos estudios de meta-análisis han indicado que, además de la diversidad  $\alpha$  bacteriana, la diversidad  $\alpha$  fúngica es mayor en los campos con rotación de cultivos (Venter *et al.*, 2016) o en los bosques caducifolios templados (He *et al.*, 2017).

En el presente estudio hemos analizado la diversidad microbiana general (población bacteriana y fúngica), con el fin de determinar las posibles conexiones entre el suelo y la microbiota relacionada con el vino de diferentes viñedos. El efecto estacional sobre la diversidad bacteriana cambia significativamente entre los estados fisiológicos de la vid. La complejidad de las comunidades bacterianas ha sido descrita generalmente como menor en reposo que en lloro o maduración (verano) (Kaiser *et al.*, 2011; Koranda *et al.*, 2013), y nuestros resultados están de acuerdo con esta observación. Por consiguiente, en base a los datos obtenidos podemos plantear la posibilidad de que la comunidad bacteriana del suelo se pueda utilizar como un nuevo parámetro biológico que se ha de considerar en las estrategias de zonificación en los suelos vitícolas.



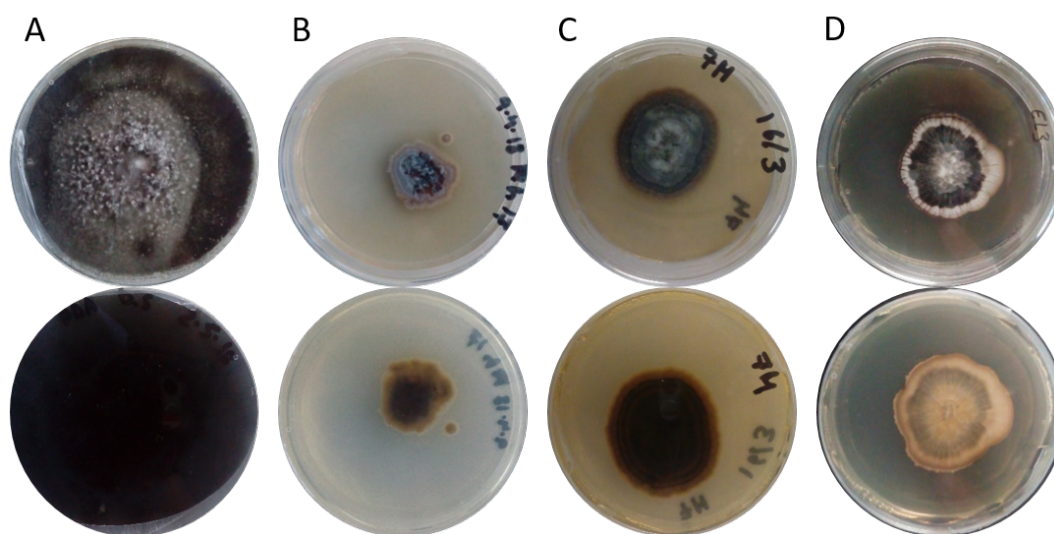
# 9. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN MADERA DE VID

## 9.1. Resultados

La detección e identificación de hongos fitopatógenos en madera de vid se ha realizado, en primer lugar, mediante PCR y posterior secuenciación Sanger (Sanger *et al.*, 1977) a partir de las cepas de hongos fitopatógenos aislados de madera muerta de vid en medio de cultivo PDA. La recuperación de hongos fitopatógenos de madera implica tiempos de incubación muy dilatados, llegando a los 30 días crecimiento. Para una detección rápida, se hace necesario la implantación de una técnica de detección, de hongos fitopatógenos, independiente de cultivo mediante técnicas de PCR que permitan el diagnóstico rápido ante una posible infección en madera sana.

### 9.1.1. Identificación de hongos fitopatógenos viables cultivables en plantones de vid

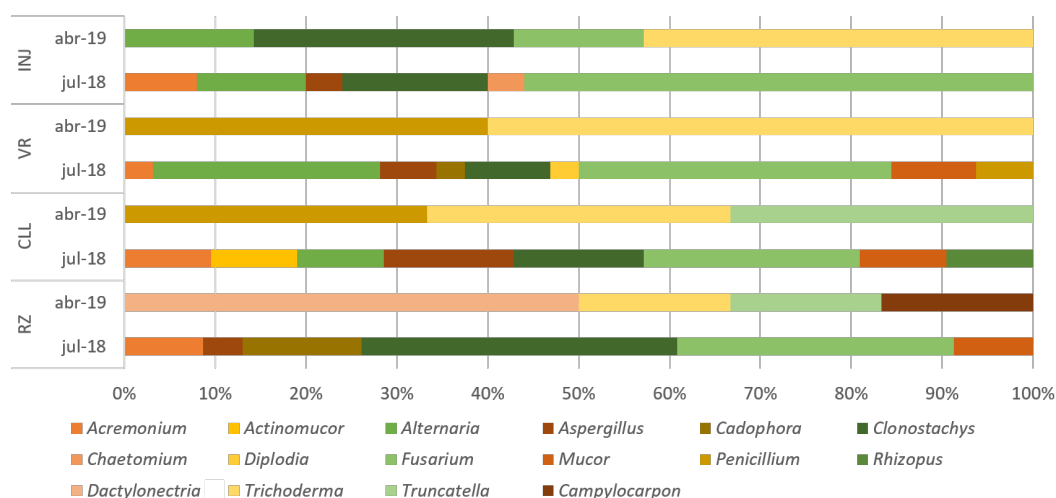
Se han procesado 15 plantones procedentes de vivero para la realización de los trabajos de detección de hongos fitopatógenos viables cultivables. La extracción de las diferentes muestras se efectuó en cuatro localizaciones estratégicas: raíz, vara, cuello e injerto. Se obtuvieron un total de 101 aislamientos y se realizaron un total de 70 identificaciones de hongos filamentosos empleando técnicas moleculares, evitando duplicidades de colonias que se macroscópicamente compartían características comunes (Figura 9.1).



**Figura 9.1:** Aislamiento de hongos fitopatógenos en medio PDA. **A:** *Diplodia seriata*, parcela V06 en enero de 2018; **B:** *Phaeoacremonium spp.*, parcela E04 en junio de 2017; **C:** *Phaeoacremonium spp.*, parcela E04 en enero de 2018; **D:** *Phaeomoniella chlamydospora*, parcela A05 en enero de 2018.

Por otro lado, el número de aislamientos de hongos filamentosos patógenos causantes de enfermedades de madera de la vid se reduce a cinco: cuatro aislamientos de *Cadophora luteo-olivacea* y un aislamiento del género *Diplodia*. Los restantes aislamientos pertenecen a géneros que no se han asociado a las enfermedades de madera de la vid. Entre todos los aislamientos, destacan, por número, los aislamientos de los géneros *Fusarium*, *Clonostachys* y *Alternaria*. Los géneros *Clonostachys* y *Alternaria* poseen un cierto papel protector o de bio-control frente a la colonización o propagación de otros géneros o especies causantes de enfermedades fúngicas de madera de la vid.

La presencia de *Trichoderma* en las muestras de madera analizadas en abril de 2019 confirman la efectividad del tratamiento biológico que aplica esta bodega contra los hongos fitopatógenos presentes. La evidencia de este efecto protector *Trichoderma* se observa en raíz donde el género *Cadophora* detectado en el material procedente de vivero no se detecta transcurridos 9 meses de cultivo, en abril del 2019. Se observa entre un 16 % y un 61 % de prevalencia en madera de *Trichoderma* en relación a los hongos filamentosos identificados (Figura 9.2).



**Figura 9.2:** Incidencia de los géneros de hongos filamentosos endófitos, identificados mediante técnicas moleculares, encontrados en las plantas jóvenes de vid en material procedente de vivero (julio 2018) y transcurridos 9 meses de la plantación (abril 2019) en la parcela Espantalobos (E15). Localización: raíz (RZ), cuello (CLL), vara (VR) e injerto (INJ).

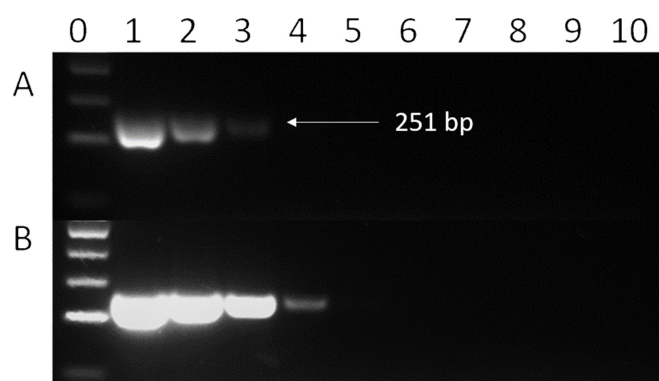
El género *Dactylonectria* se encontraba presente en el suelo de la parcela Espantalobos (E15) según los resultados de secuenciación metagenómica (Figura 8.3). Una vez plantada esta parcela y analizadas las raíces de las vides 9 meses más tarde se confirma que este hongo filamentosos ha colonizado la raíz, representado una abundancia del 50% de los hongos detectados (Figura 9.2).

Los géneros de hongos filamentosos detectados (Figura 9.2), exceptuando *Cadophora* y *Dactylonectria* y *Diplodia*, pueden producir alguna infección oportunista (como pudrición) en el caso de estrés vegetal pero no suponen una amenaza activa para la vid (Król, 2006).

### 9.1.2. Detección de hongos fitopatógenos mediante técnicas independientes de cultivo

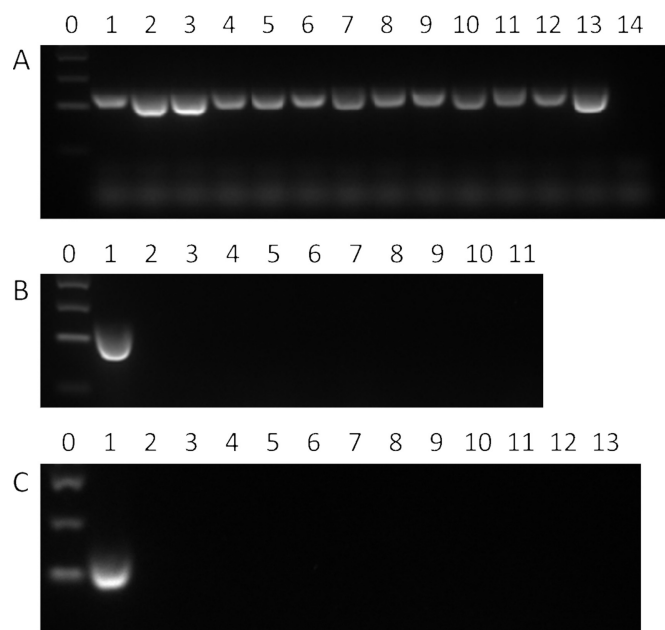
En este estudio hemos podido desarrollar un par de cebadores específicos optimizados para un protocolo tradicional de amplificación de secuencias específicas mediante técnicas de PCR para detectar la *Cadophora luteo-olivacea*, uno de los el agente causal más importante de la enfermedad de Petri. Durante la optimización del procedimiento utilizamos un extracto de ADN de la madera, negativo para la infección de *C. luteo-olivacea*, como diluyente para el ADN de CBS 357.51 para imitan las condiciones reales que se aplican con los tejidos

vegetales sospechosos de infección, lo que permite la verificación de resultados sobre un escenario real. Los compuestos polifenólicos que podría estar presente en la muestra de madera puede interferir con la reacción de amplificación por PCR *Gomes et al. (2017)*, por este motivo se ha usado BSA (para adsorber los polifenoles que retienen el ión  $Mg^{+2}$ ) y  $MgCl_2$  (para mantener la procesividad de la ADN polimerasa). Así pues, la sensibilidad del método se probó en dos condiciones y usando dos mezclas de reacción diferentes. Una de ellas estándar y la otra con los dos potenciadores de la PCR (BSA y  $MgCl_2$ ). En el primer caso, la sensibilidad obtenida para el procedimiento de PCR era 1 ng de ADN fúngico (Figura 9.3 A) y mientras que haciendo uso de BSA y  $MgCl_2$  en la mezcla de reacción PCR la sensibilidad se incrementó hasta 10 pg de ADN fúngico (Figura 9.3 B), lo que significa un aumento de la sensibilidad  $\times 100$ .



**Figura 9.3:** Verificación de la sensibilidad del método de detección rápida en gel de electroforesis mediante el uso de los cebadores CaLO3 and CaLO4 en extracto de madera con ADN de *C. luteo-olivacea* CBS 357.51. **A** Reacción de PCR estándar; **B** Reacción de PCR suplementada con BSA y  $MgCl_2$ . Carril 0 a 10: marcador de tamaño molecular, 100 ng de ADN, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, control negativo.

Los cebadores CaLO3/CaLO4 son altamente específicos para la detección de *C. luteo-olivacea* (Figura 9.4), todas las cepas analizadas (trece cepas diferentes) fueron positivas. Otras Cadoporas y diferentes representantes de las especies endófitas de la vid no mostraron amplificación alguna.



**Figura 9.4:** Especificidad de los *primers* CaLO3/CaLO4: **A** cepas de *Cadophora luteo-olivacea*, carriles 0 a 15: marcador de tamaño molecular, CBS 357.51, CBS 109.296, CBS 141.41, R14-02, R15-02, V13-02, BT-393, BT-301, A5-334, A5-933, A5-717, A5-1177, GIHF-240, control negativo; **B** Especificidad para diferentes especies del género *Cadophora*, carril 0 a 11: marcador de tamaño molecular, *C. luteo-olivacea* CBS 357.51, *C. viticola* CBS 139.517, *C. viticola* GIHF029, *C. melinii* CBS 268.33, *C. melinii* GIHF135, *C. melinii* GIHF136, *C. melinii* GIHF137, *C. malorum* CBS 266.31, *C. novi-eboraci* CBS 101.359, *C. spadici* CBS 111.743, control negativo; **C** Especificidad para especies no pertenecientes al género *Cadophora*, carril 0 a 13: marcador de tamaño molecular, *Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum*, *Diplodia seriata*, *Dactylonectria* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Actinomucor* spp., *Alternaria alternata*, *Clonostachys rosea*, control negativo.

## 9.2. Discusión

*Trichoderma harzianum* es un agente de biocontrol que permite prevenir el desarrollo de hongos patógenos presentes en el suelo. Este efecto protector puede ser debido a diferentes mecanismos como la competición por espacio y nutrientes, la secreción de enzimas quitinolíticas, microparasitismo y la producción de compuestos inhibidores (Haran *et al.*, 1996; Zimand *et al.*, 1996). En este estudio se ha podido comprobar la prevalencia de *Trichoderma* tras la

plantación evitando o reduciendo la abundancia de enfermedades en vara, cuello e injerto. Esta explotación vitícola trabaja con *Trichoderma* habitualmente y este hongo filamentoso se ha implantado con éxito desde otras parcelas, ya que no se detecta su presencia en material de vivero. Aunque en la parte aérea de la vid la protección que ofrece este hongo filamento es efectiva, en la raíz su presencia no evita la colonización de *Dactylonectria*. Este hongo fitopatógeno se detectó en suelo antes de efectuar la plantación y es el origen de este proceso infectivo en esta parcela. Existen otros agentes de biocontrol con especies bacterianas como *Bacillus subtilis* el cual evita la proliferación de *Eutypa lata* en viñedo (Ferreira *et al.*, 1991), aunque en este estudio no se ha cuantificado su acción debido a que principalmente el trabajo se centra en la detección de hongos filamentosos. Tampoco se ha detectado ningún hongo filamentoso perteneciente al género *Eutypa* siendo posible su ausencia o un posible efecto de biocontrol mediado *Bacillus subtilis* no reportado en este estudio.

Respecto a la detección rápida de *Cadophora* el umbral de sensibilidad mejora con el uso de BSA y  $MgCl_2$ , incrementando en 100 veces la sensibilidad de 1 ng a 10 pg en cantidades menores de ADN en la reacción de PCR. En la bibliografía se han descrito dos conjuntos de cebadores específicos para la *C. luteo-olivacea*. Navarrete *et al.* (2011) desarrollaron un par de cebadores cuya sensibilidad era de 0,1 ng usando ADN puro de hongos Spadaro *et al.* (2011) y describieron otro conjunto de cebadores cuya sensibilidad no se encuentra documentada. En este trabajo se transfiere la secuencia de los *primers* diseñados para la detección de *C. luteo-olivacea* así como el protocolo empleado para la extracción de ADN de madera. Además de mejorar el umbral de detección del ADN de partida.

## V. DISCUSIÓN FINAL



El suelo de las parcelas estudiadas se compone principalmente de filosilicatos. Este grupo mineral permite estimar (78 % de confianza) la capacidad de retención hídrica en el suelo vitícola mediante la exploración de las muestras con DRX. También sería posible predecir la acidez de un suelo mediante el estudio por DRX debido a que la acidez de un suelo también depende del porcentaje de silicatos o arenas presentes en el mismo (Swędrzyńska & Grześ, 2015). Las muestras de suelo estudiadas mediante DRX muestran porcentajes de calcita elevados (32,4-38,9) % confirmando un elevado porcentaje de caliza relacionado con un suelo moderadamente básico ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = [7,84 \pm 0,01, 9,58 \pm 0,04]$ ). Estos valores de pH suponen una baja bio-disponibilidad de fósforo y un aumento en los niveles de calcio y magnesio (Castellanos, 2014; Osorio, 2012). El pH elevado en los suelos estudiados podría ser una de las razones por la cual aumente el número de efectivos de bacterias movilizadoras de fósforo, supliendo el déficit de fósforo disponible para la vid. En cuanto a la capacidad de retención del agua del suelo, se observan parcelas en el grupo ARN (Arenosas) que difieren el comportamiento de las demás parcelas estudiadas. A estas parcelas ARN se les aplica pellets orgánicos de oveja que podrían aumentar la capacidad de retención hídrica.

El aumento de temperatura y contenido de agua en el suelo promueven un mayor recuento de bacterias heterótrofas en el estado de lloro de forma significativa. Los hongos filamentosos y levaduras aumentan su concentración (UFC/gSS) en reposo respecto a maduración y lloro, este efecto estacional no ocurre en otros viñedos donde la población de hongos filamentosos se mantiene estable (Corneo *et al.*, 2013). Posiblemente este aumento es debido a la resistencia a bajas temperaturas gracias a la pared celular de quitina y la producción solutos anticongelantes como glicerol mediados por proteínas CSP (*Cold Shock Protein*) lo cuales mantienen la viabilidad y la integridad celular (Al-Fageeh & Smales, 2006). Según López-Piñeiro *et al.* (2013) el incremento de la población de levaduras en el suelo depende de los azúcares fermentables que están disponibles en el suelo durante los 3 meses después de la vendimia y por la

actividad humana en el viñedo. Esta evidencia concuerda con los resultados obtenidos de recuento de levaduras, relacionado también con el mantenimiento de restos de poda (incluyendo racimos) en el suelo. En cuanto al recuento de las bacterias NPK, se observa un aumento de concentración de bacterias fijadoras de nitrógeno y movilizadoras de fósforo en lloro y maduración, disminuyendo de forma significativa en reposo. Este marcado comportamiento estacional se debe a factores climáticos como la temperatura (Schostag *et al.*, 2015) o bien es posible que la vid comunique de los requerimientos nutricionales mediante señales químicas a la microbiota edáfica asociada (Corral-Lugo *et al.*, 2016; Steidle *et al.*, 2001). Las bacterias movilizadoras de potasio (KSB) aumentan en concentración en el estado de lloro de forma significativa. Este incremento notable de KSB promueve la generación de fitohormonas (Jha & Subramanian, 2016) que señalizan la producción anual de hojas y bayas. La concentración de bacterias amilolíticas aumenta de forma gradual desde lloro hasta maduración. En este lapso de tiempo se realiza la poda en verde y desnieto de la vid. Esta práctica y los restos de poda que caen al suelo aumentan la materia orgánica estimulando la actividad biológica y aumentando la productividad de este (Crovetto, 1996, 2002). Esta práctica agrícola promueve el aumento de la población de bacterias amilolíticas debido a un aumento de almidón en el suelo.

En cuanto a las medidas de fosfatasa alcalina, en los suelos de las parcelas pertenecientes a Vallejos los valores de actividad en V03 y V07 son notablemente menores que en la parcela V06, pese a la contigüidad de las mismas y un pH similar en las tres parcelas (8,73; 8,70; 8,67). Esto puede deberse a al porcentaje de caliza total en el suelo de estas parcelas. El ión  $\text{Ca}^{2+}$  reduce la actividad fosfatasa alcalina en algunos microorganismos como, por ejemplo, del género *Aspergillus* (Sakurai *et al.*, 1981) pudiendo ocurrir el mismo suceso con otros hongos filamentosos. En las parcelas V03 y V07 se ha medido una cantidad de calcio de 7,10 mg y 6,18 mg, respectivamente, en la parcela V06 el calcio medido es de 9,01 mg. Por tanto, es posible una reducción de la actividad fosfatasa debido a la concentración de calcio, aunque se debería complementar con el análisis de más muestras para verificar este efecto.

La respiración inducida por sustrato muestra valores reducidos en el caso de las parcelas arenosas (ARN). Las parcelas V03 y V07 (con porcentaje de arena gruesa 15,3 y 11,20 %, respectivamente) además de presentar un SIR menor también presentan una capacidad de retención hídrica menor que el resto de las parcelas ARN (8 % de arena gruesa). Por tanto, la respiración disminuye a porcentajes crecientes de arena. Esto es debido a que la relación superficie/volumen es menor en suelos con alto un porcentaje mayor de arena gruesa reduciendo la adhesión de microorganismos por limitación superficial y, por

tanto, una menor respiración microbiana. Los resultados obtenidos muestran un aumento de respiración en suelos arcillosos respecto a arenosos, difiriendo con los trabajos de Wang *et al.* (2003) y Franzluebbers (1999) en los cuales existe anti-correlación entre SIR y contenido de arcilla en el suelo.

Las formas de resistencia de los microorganismos del suelo dificultan el proceso de extracción de ADN. Esta situación se da en sistemas monocultivo de forma general (Corneo *et al.*, 2013) y, en particular, en suelos vitícolas donde el ADN total aislado del suelo disminuye significativamente (Dequiedt *et al.*, 2011) si lo comparamos con otros suelos de diferente uso. La amplificación del ADN se supone homogénea pero podría sobrestimar o subestimar la población bacteriana (Kircher & Kelso, 2010). En cualquier caso, la técnica molecular empleada permite la monitorización de la biodiversidad de un suelo y ayuda a mantener al cultivo libre de enfermedades, ya que una comunidad microbiana edáfica deprimida o con baja diversidad facilitaría el desarrollo de enfermedades en la vid (Corti *et al.*, 2007). La biodiversidad microbiana de un determinado suelo agrícola podría relacionarse también con su capacidad metabólica para degradar las enmiendas aplicadas y mineralizarlas en el sustrato (Montiel-Rozas *et al.*, 2018). Aunque en determinados nichos como el entorno vitícola, un aumento de biodiversidad bacteriana no implicaría una diversidad funcional mayor debido a una actividad metabólica redundante (Allison & Martiny, 2008; Bardgett & Van Der Putten, 2014). Existe una suposición general que indica que cuanto mayor es la heterogeneidad ambiental mayor es la diversidad de los organismos complejos, lo cual que indica que los hábitats más heterogéneos suelen presentar una mayor diversidad de especies (Heino *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar del reconocido papel central de las bacterias en la fertilidad de los suelos, se ha informado de un menor conocimiento del vínculo entre la heterogeneidad ambiental y la diversidad bacteriana (Dickens *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2015). En varias investigaciones se ha confirmado que las modificaciones de los parámetros ambientales y físico-químicos suelen tender a modificar de manera sustancial la composición de su comunidad bacteriana (Horner-Devine *et al.*, 2004; Ranjard *et al.*, 2013), lo que sugiere una heterogeneidad mediada por factores abióticos. El efecto estacional sobre la diversidad bacteriana cambia significativamente entre los estados fisiológicos de la vid. La complejidad de las comunidades bacterianas ha sido descrita generalmente como menor en reposo que en lloreo o maduración (Kaiser *et al.*, 2011; Koranda *et al.*, 2013), y nuestros resultados están de acuerdo con esta observación. Por consiguiente, en base a los datos obtenidos podemos plantear la posibilidad de que la comunidad bacteriana del suelo se pueda utilizar como un nuevo parámetro biológico que se ha de considerar en las estrategias de zonificación en los suelos vitícolas (Alonso *et al.*, 2019).

*Trichoderma harzianum* es un agente de biocontrol que permite prevenir el desarrollo de hongos patógenos presentes en el suelo. Aunque en la parte aérea de la vid la protección que ofrece este hongo filamentoso es efectiva, en la raíz su presencia no evita la colonización de *Dactylonectria*. Existen otros agentes de biocontrol con especies bacterianas como *Bacillus subtilis* el cual evita la proliferación de *Eutypa lata* en viñedo (Ferreira *et al.*, 1991). Aunque en este estudio no se ha cuantificado su acción, no se ha detectado ningún representante del género *Eutypa*, siendo plausible un posible efecto de biocontrol mediado por *B. subtilis*.

Para la detección de *Cadophora luteo-olivacea* mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación por PCR es necesario el diseño de cebadores específicos a nivel de especie. En este trabajo se han diseñado cebadores específicos para *C. luteo-olivacea*, los cuales permiten una mayor resolución a nivel tanto especie como de otros géneros de hongos fitopatógenos. A diferencia de otros métodos publicados (Navarrete *et al.*, 2011), nuestro método permite detectar *C. luteo-olivacea* directamente en muestras de madera, sin necesidad de efectuar la extracción y purificación del ADN de este hongo fitopatógeno (Spadaro *et al.*, 2011), evitando así el aislamiento mediante técnicas microbiológicas clásicas. Además, la adición a la reacción de PCR de BSA y MgCl<sub>2</sub> permite una mejora en el umbral de detección (Gomes *et al.*, 2017) incrementando en 100 veces la sensibilidad respecto al método descrito en el trabajo de Navarrete *et al.* (2011) y un aumento de sensibilidad 10 veces mayor que el publicado por Spadaro *et al.* (2011).

## VI. CONCLUSIONES



1. La capacidad de campo habitualmente se mide procediendo a la eliminación del agua retenida en el suelo mediante sobrepresión. Mediante el análisis mineralógico usando la técnica de difracción de rayos X, hemos podido estimar de forma indirecta la cantidad máxima de agua del suelo accesible para la vid, además de su composición mineralógica, acortando los tiempos en la extracción de datos.
2. Se ha comprobado que mediante la aplicación de enmiendas con alto contenido orgánico la retención de agua en suelos arenosos aumenta. Así mismo, se ha observado que la presencia de hongos micorrícicos (Augé *et al.*, 2001) y el tratamiento con pellet orgánicos de oveja aumentan la capacidad de retención hídrica en el suelo reduciendo el riego y, por tanto, permitiendo un uso del agua más responsable.
3. La práctica agrícola de la poda en verde y el mantenimiento del material vegetal retirado en el suelo favorece la descomposición del almidón, contenido en los amiloplastos de las hojas de la vid. Se ha comprobado que está mediada por bacterias amilolíticas, liberando azúcares sencillos bio-disponibles para la nutrición de la comunidad microbiana edáfica. Esta práctica es muy recomendable debido a la sencillez en la reutilización de los restos de poda *in situ* optimizando el tiempo de laboreo.
4. La medida de respiración de la comunidad microbiana presente en el suelo es un buen indicador de la actividad metabólica del mismo (Alonso, 2016), informando sobre la idoneidad de un suelo para el cultivo de vid en el cual se debe llegar a un compromiso entre textura y actividad microbiana. En suelos arenosos la respiración disminuye mientras que en arcillosos aumenta debido a la densidad de microorganismos en relación al ratio superficie/volumen de la composición del suelo. En el viñedo estudiado existen parcelas con muy diferentes texturas y la respiración microbiana informa del estado de actividad del suelo para la toma de decisiones respecto a la posible aplicación de enmiendas orgánicas.

5. El suelo actúa como reservorio de levaduras y hongos filamentosos durante el estado fisiológico de reposo. Los resultados obtenidos muestran un descenso de estas poblaciones en lloro y maduración, lo que podría indicar que factores climatológicos como la lluvia o el viento transportan a estos microorganismos a las zonas aéreas de la vid, pudiendo facilitar la transmisión de hongos fitopatógenos de la madera a otras vides sanas. Un estudio exhaustivo de las poblaciones de hongos en el suelo contrastado con los de la superficie de la madera de la vid permitiría comprobar este traslado de hongos filamentosos de suelo a planta y anticipar una posible patología en la madera en zonas distantes al foco de infección.
6. La presencia de *Dactylonectria* en el suelo sin explotar produce la infección de las raíces de las nuevas vides plantadas. Este proceso infectivo ocurre en un corto periodo de tiempo (9 meses) y con una abundancia del 50 % respecto al resto de hongos detectados en la raíz. El estudio del suelo no cultivado, con anterioridad al cultivo de vid, mediante detección de hongos fitopatógenos determina el éxito productivo de las vides en una futura explotación y permite la aplicación de tratamientos preventivos si fueran necesarios.
7. El género *Eutypa*, agente causal de eutipiosis, y la enfermedad de la vid denominada yesca se encuentra con frecuencia presente en madera de vid con lesiones visibles macroscópicamente. En un estado avanzado de la enfermedad la presencia de eutipiosis y yesca son fácilmente observables. Para evitar la propagación de EFMV el diagnóstico *de visu* no es eficaz, es necesario detectar estas EFMV mediante técnicas moleculares de forma temprana para detener el avance de la enfermedad. El suelo, actuando como reservorio de microorganismos, ya esté cultivado o con pretensiones de explotación, permite predecir el futuro estado sanitario de las vides. Por tanto, la detección de hongos fitopatógenos en suelo empleando técnicas meta-taxonómicas es un marcador esencial para efectuar posibles acciones preventivas antes de plantar vides o para seguir un monitoreo exhaustivo del viñedo en explotación y actuar de forma temprana con las medidas correctoras necesarias.
8. El hongo fitopatógeno *Cadophora luteo-olivacea* no se encuentra presente en el suelo pero sí en la madera sin signos de infección. Por tanto, es necesario la detección de *Cadophora luteo-olivacea* de forma rápida y sencilla en la madera sana con fines preventivos. Hemos diseñado los cebadores CaLO3-CaLO4 para la detección por PCR de *Cadophora luteo-olivacea* a partir de madera sana. No es necesario el aislamiento de *Cadophora luteo-olivacea* por técnicas microbiológicas clásicas, simplemente se extrae el

ADN presente en la madera de forma directa, reduciendo el tiempo de análisis. Este test permite el seguimiento del estado fitosanitario del viñedo con procedimientos adaptables a cualquier laboratorio de viticultura de forma rápida y sencilla, anticipando cualquier suceso mediado por *Cadophora* que reduzca el rendimiento de la explotación vitícola.



# Futuras líneas de investigación

En este trabajo se han obtenido y analizado un gran número de variables para caracterizar el suelo y la microbiota que habita en él. El contenido de esta tesis se basa en el estudio del físico, bio-químico y microbiológico del suelo desde un punto de vista centrado en la fertilidad y el estado sanitario del cultivo. Los resultados obtenidos permiten la caracterización del suelo como reservorio de microorganismos patógenos para la vid aunque para definir las interacciones entre la vid y los agentes etiológicos de las EFMV sería necesario analizar la rizosfera. Podría complementarse en un futuro con la monitorización de la rizosfera en parcelas afectadas por hongos fitopatógenos y determinar si la microbiota edáfica presenta alguna relación con la infección con vía de entrada en raíz.

El estudio de la retención de agua mediante la aplicación de enmiendas orgánicas podría optimizar los recursos hídricos del viñedo, además de ser una fuente de nutrición microbiana importante.

Para estudiar las relaciones dinámicas de las poblaciones viables del viñedo se podría determinar qué ocurre con las bacterias amilolíticas y por qué son diferentes los recuentos de estas en lloro, maduración y reposo. Probablemente, como se ha comentado en la discusión, esto es debido al efecto de la poda en verde, en la cual la hojas y ramas caen al suelo. Para comprobarlo se debería hacer un estudio enzimático de lignin-peroxidasa (EC 1.11.1.14) o de poblaciones microbianas que presenten esta actividad. En cuanto a la interacción que el tipo de suelo pudiera tener con la microbiota viable se podría obtener más información si el número de muestras analizadas fuera mayor al recogido. Sobre todo en el caso de suelos calizos que podrían interaccionar con las poblaciones de bacterias movilizadoras de fósforo y potasio.

Resultaría interesante comprobar el efecto de biocontrol de *Bacillus subtilis* en la parcela Espantalobos debido a que no se detecta *Eutypa* en suelo ni madera. De forma controlada, y con la parcela dividida, se podría efectuar

el tratamiento en una porción y en la otra sin aplicar el tratamiento con *B. subtilis*.

Por otro lado, el desarrollo de test económicos que no necesitara de equipos de laboratorio sería una muy buena opción para monitorizar el estado del viñedo. Por ejemplo, los test inmunológicos de flujo lateral (*Lateral Flow Test*, LFT) son ensayos rápidos basados en la movilidad de anticuerpos específicos para la detección de la enfermedad que deseemos detectar. Una vez extraída la muestra y homogeneizada, únicamente se deposita la muestra en el dispositivo y el tampón de carga eluye la muestra hasta la banda de detección donde se mostrará coloreada en caso positivo. Para el desarrollo del LFT es necesario un estudio previo *in-silico* para diseñar los anticuerpos específicos de la EFMV y una etapa posterior para verificar la especificidad en una muestra real.

Por último, suscita un gran interés el cómo se comportaría el suelo respecto a las EFMV y la absorción de nutrientes si bajáramos el pH del suelo intencionadamente con un fertilizante orgánico.

# Bibliografía

- Al-Fageeh, M. B. & Smales, C. M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal*, 397(2):247–259.
- Aleksandrov, V., Blagodyr, R., & Ilev, I. (1967). Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiologichnyi zhurnal*, 29:111–114.
- Alexander, M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211(4478):132–138.
- Allison, S. D. & Martiny, J. B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1):11512–11519.
- Alonso, A. (2016). Estudio ecofuncional de la microbiota asociada a suelos de interés vitivinícola. T.F.M., Universidad Complutense de Madrid. Curso 2015-2016.
- Alonso, A., de Celis, M., Ruiz, J., Vicente, J., Navascués, E., Acedo, A., Ortiz-Álvarez, R., Belda, I., Santos, A., Gómez-Flechoso, M. Á., *et al.* (2019). Looking at the origin: Some insights into the general and fermentative microbiota of vineyard soils. *Fermentation*, 5(3):78.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403–410.
- AQUASTAT, F. (2015). Water uses. 2016. *Internet: www.fao.org/nr/water/aquastat/water\_use/index.stm (accessed 17 August 2018).*
- Atlas, R. M. & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson-Addison Wesley.
- Augé, R. M., Stodola, A. J., Tims, J. E., & Saxton, A. M. (2001). Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*, 230(1):87–97.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Bååth, E., Frostegård, Å., Pennanen, T., & Fritze, H. (1995). Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(2):229–240.
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., & Robledo, C. (2008). *Infostat: manual del usuario*.
- Bardgett, R. D. & Van Der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528):505.
- Beare, M. H., Parmelee, R. W., Hendrix, P. F., Cheng, W., Coleman, D. C., & Crossley Jr, D. (1992). Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems. *Ecological Monographs*, 62(4):569–591.
- Berg, G. & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1):1–13.
- Bragg, W. H. & Bragg, W. L. (1913). The reflection of X-rays by crystals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 88(605):428–438.
- Bragg, W. L. (1913). The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89(610):248–277.
- Bramley, R. & White, R. (1989). The effect of pH, liming, moisture and temperature on the activity of nitrifiers in a soil under pasture. *Soil Research*, 27(4):711–724.
- Brejda, J. J., Moorman, T. B., Karlen, D. L., & Dao, T. H. (2000). Identification of regional soil quality factors and indicators: I. Central and Southern High Plains. *Soil Science Society of America Journal*, 64(6):2115–2124.
- Calderón, F. J., Jackson, L. E., Scow, K. M., & Rolston, D. E. (2000). Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11-12):1547–1559.
- Carlucci, A., Lops, F., Mostert, L., Halleen, F., & Raimondo, M. L. Occurrence fungi causing black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 56:10–39.

- Castellanos, J. (2014). Acidez del suelo y su corrección. *Hojas técnicas de Fertilab, México*. 4p.
- Catal, M., Jordan, S., Butterworth, S., & Schilder, A. (2007). Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 97(6):737–747.
- Cenis, J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9):2380.
- Colwell, R. R. & Grimes, D. J. (2000). *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM press.
- Cooperband, L. (2002). Building soil organic matter with organic amendments. *Centre for Integrated Agricultural Systems, College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin, Madison*.
- Corneo, P. E., Pellegrini, A., Cappellin, L., Roncador, M., Chierici, M., Gessler, C., & Pertot, I. (2013). Microbial community structure in vineyard soils across altitudinal gradients and in different seasons. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3):588–602.
- Corral-Lugo, A., Daddaoua, A., Ortega, A., Espinosa-Urgel, M., & Krell, T. (2016). Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Science Signaling*, 9(409):ra1–ra1.
- Corti, G., Cuniglio, R., Agnelli, A., & Ricci, F. (2007). Influence of soil factors on esca infection in a vineyard soil on pliocene deposits. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(5-6):661–678.
- Crovetto, C. (1996). Stubble over the soil. *The Vital Role of the Plant Residue in Soil Management to Improve Soil Quality. Special Publication*, 19.
- Crovetto, C. (2002). Cero labranza: Los rastrojos, la nutrición del suelo y su relación con la fertilidad de las plantas. *Trama Impresores SA, Talcahuano, Chile*. 225pp.
- Dequiedt, S., Saby, N., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P., & Ranjard, L. (2011). Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20(4):641–652.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2018). Infostat versión 2018. Centro de Transferencia Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Dick, W. & Tabatabai, M. A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. *Soil microbial ecology: application in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker, New York, pages 95–125.
- Dickens, S., Allen, E. B., Santiago, L., & Crowley, D. (2013). Exotic annuals reduce soil heterogeneity in coastal sage scrub soil chemical and biological characteristics. *Soil Biology and Biochemistry*, 58:70–81.
- Doran, J. W. & Parkin, T. B. (1994). Defining and assessing soil quality. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, (35):1–21.
- FAO, F. (2018). Crop statistics.
- Fawcett, T. G., Kabekkodu, S. N., Blanton, J. R., & Blanton, T. N. (2017). Chemical analysis by diffraction: the powder diffraction file™. *Powder Diffraction*, 32(2):63–71.
- Fechner, G. (1860). Elemente der psychophysik, breitkopf und härtel. *Leipzig: Breitkopf und Härtel*.
- Ferreira, J., Matthee, F., & Thomas, A. (1991). Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 81(3):283–287.
- Fougère-Rifot, M., Park, H., Cherrad, M., Darné, G., & Bouard, J. (1995). Plastés, amidon et chlorophylle dans la baie de *Vitis vinifera* L. au cours de son développement. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 29(4):213–225.
- Franzluebbers, A. J. (1999). Potential C and N mineralization and microbial biomass from intact and increasingly disturbed soils of varying texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(8):1083–1090.
- Funnell-Harris, D. L. & Pedersen, J. F. (2011). Presence of *Fusarium spp.* in air and soil associated with sorghum fields. *Plant Disease*, 95(6):648–656.
- Gallego, M. R., Vivaldi, J. M. M., & Pozas, J. M. M. (1969). Análisis cuantitativo de filosilicatos de la arcilla por difracción de Rayos-X III. *Influencia de la Sustitución insomórfica y de la Cristalinidad*. *Anal. Química (Español)* 65, pages 25–29.

- García Izquierdo, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Garg, N. & Chandel, S. (2011). Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. In *Sustainable Agriculture Volume 2*, pages 907–930. Springer.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1-2):1–15.
- Gomes, C., Alonso, A., Marquina, D., Guardià, M., López-Matayoshi, C., Palomo-Díez, S., Perea-Peréz, B., Gibaja, J. F., & Arroyo-Pardo, E. (2017). “Inhibiting inhibitors”: Preliminary results of a new “DNA extraction-amplification” disinhibition technique in critical human samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6:e197–e199.
- Goyal, S., Chander, K., Mundra, M., & Kapoor, K. (1999). Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organic matter and soil microbial properties under tropical conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 29(2):196–200.
- Granatstein, D. & Bezdicek, D. (1992). The need for a soil quality index: local and regional perspectives. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7(1-2):12–16.
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., & Saxena, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(3):255–260.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., & Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9):980–985.
- He, J., Tedersoo, L., Hu, A., Han, C., He, D., Wei, H., Jiao, M., Anslan, S., Nie, Y., & Jia, Y. (2017). Greater diversity of soil fungal communities and distinguishable seasonal variation in temperate deciduous forests compared with subtropical evergreen forests of eastern China. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(7).
- Heino, J., Melo, A. S., & Bini, L. M. (2015). Reconceptualising the beta diversity-environmental heterogeneity relationship in running water systems. *Freshwater Biology*, 60(2):223–235.

- Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., & Bohannan, B. J. (2004). A taxa–area relationship for bacteria. *Nature*, 432(7018):750–753.
- Jha, Y. & Subramanian, R. (2016). Regulation of plant physiology and antioxidant enzymes for alleviating salinity stress by potassium-mobilizing bacteria. In *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*, pages 149–162. Springer.
- Johnson, M. J., Lee, K. Y., & Scow, K. M. (2003). DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, 114(3-4):279–303.
- Kaiser, C., Fuchslueger, L., Koranda, M., Gorfer, M., Stange, C. F., Kitzler, B., Rasche, F., Strauss, J., Sessitsch, A., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2011). Plants control the seasonal dynamics of microbial N cycling in a beech forest soil by belowground C allocation. *Ecology*, 92(5):1036–1051.
- Karlen, D., Mausbach, M. J., Doran, J., Cline, R., Harris, R., & Schuman, G. (1997). Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61(1):4–10.
- Kircher, M. & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *Bioessays*, 32(6):524–536.
- Koranda, M., Kaiser, C., Fuchslueger, L., Kitzler, B., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S., & Richter, A. (2013). Seasonal variation in functional properties of microbial communities in beech forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 60:95–104.
- Król, E. (2006). Fungi inhabiting decaying grapevine (*Vitis spp.*) cuttings. *Journal of Plant Protection Research*, 4(46):353–358.
- Lardner, R., Stummer, B. E., Sosnowski, M. R., & Scott, E. S. (2005). Molecular identification and detection of *Eutypa lata* in grapevine. *Mycological Research*, 109(7):799–808.
- Lejon, D. P. H., Chaussod, R., Ranger, J., & Ranjard, L. (2005). Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microbial Ecology*, 50(4):614–625.
- Lejon, D. P. H., Sebastia, J., Lamy, I., Chaussod, R., & Ranjard, L. (2007). Relationships between soil organic status and microbial community density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microbial Ecology*, 53(4):650–663.

- López-Piñeiro, A., Muñoz, A., Zamora, E., & Ramírez, M. (2013). Influence of the management regime and phenological state of the vines on the physicochemical properties and the seasonal fluctuations of the microorganisms in a vineyard soil under semi-arid conditions. *Soil and Tillage Research*, 126:119–126.
- Mikhnovskaya, A. D., Kirichenko, T. P., & Panchenko, V. P. (1993). Microbiological processes of transformation of organic matter with different cultivation practices of typical chernozem. *Eurasian Soil Science*, 25(5):100–109.
- Miller, S. A., Beed, F. D., & Harmon, C. L. (2009). Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annual Review of Phytopathology*, 47:15–38.
- Montiel-Rozas, M. M., Domínguez, M. T., Madejón, E., Madejón, P., Pastorelli, R., & Renella, G. (2018). Long-term effects of organic amendments on bacterial and fungal communities in a degraded mediterranean soil. *Geoderma*, 332:20–28.
- Mustafa, G., Kookana, R. S., & Singh, B. (2006). Desorption of cadmium from goethite: effects of pH, temperature and aging. *Chemosphere*, 64(5):856–865.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4):655–670.
- Navarrete, F., Abreo, E., Martínez, S., Bettucci, L., & Lupo, S. (2011). Pathogenicity and molecular detection of Uruguayan isolates of *Greeneria uvicola* and *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 50:S166–S175.
- Nicolardot, B., Bouziri, L., Bastian, F., & Ranjard, L. (2007). A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7):1631–1644.
- Okano, Y., Hristova, K. R., Leutenegger, C. M., Jackson, L. E., Denison, R. F., Gebreyesus, B., Lebauer, D., & Scow, K. M. (2004). Application of real-time pcr to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2):1008–1016.
- Olalde, P. & Aguilera, L. (1998). Microorganismos y biodiversidad. *Terra*, 16(3):289–292.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43(1):93–100.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Osorio, N. (2012). pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal*, 1(4):1–4.
- Paetz, A. & Cröβmann, G. (1994). Problems and results in the development of international standards for sampling and pretreatment of soils. *Environmental sampling for trace analysis*, pages 321–334.
- Peay, K. G., Baraloto, C., & Fine, P. V. (2013). Strong coupling of plant and fungal community structure across western amazonian rainforests. *The ISME journal*, 7(9):1852–1861.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17:362–370.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain. *System*, 15:439–446.
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Prévost-Bouré, N. C., Thioulouse, J., Saby, N., Lelièvre, M., Maron, P., Morin, F., Bispo, A., Jolivet, C., Arrouays, D., & Lemanceau, P. (2013). Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nature communications*, 4(1):1–10.
- Ranjbar, F. & Jalali, M. (2011). Effects of plant residues and calcite amendments on soil sodicity. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(6):874–883.
- Raynaud, X. & Nunan, N. (2014). Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS One*, 9(1):e87217.
- Reis, P., Cabral, A., Nascimento, T., Oliveira, H., & Rego, C. (2013). Diversity of ilyonectria species in a young vineyard affected by black foot disease. *Phytopathologia Mediterranea*, pages 335–346.
- Rivera, M. A. S. (2006). Operating the Siemens XRD Diffraktometer D5000.
- Roco, A. & Pérez, L. M. (2001). In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(2):1–2.
- Romero, E. G. (1988). *Estudio mineralógico y estratigráfico de las arcillas de las facies centrales del Neógeno del borde sur de la Cuenca del Tajo*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid.
- Roper, M. & Ophel-Keller, K. (1997). *Soil microflora as bioindicators of soil health*. CAB International.

- Roszak, D. B. & Colwell, R. R. (1987). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12):2889–2893.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols*, pages 365–386. Springer.
- Saccà, M. L., Manici, L. M., Caputo, F., & Frisullo, S. (2018). Qualitative and quantitative molecular analysis indicate the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in vineyard soils. *Journal of Phytopathology*, 166(11-12):821–831.
- Sakurai, Y., Toda, K., & Shiota, H. (1981). Multiple forms and some properties of alkaline phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* on solid medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(9):1959–1967.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12):5463–5467.
- Schmid, F., Moser, G., Müller, H., & Berg, G. (2011). Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(6):2188–2191.
- Schostag, M., Stibal, M., Jacobsen, C. S., Bælum, J., Taş, N., Elberling, B., Jansson, J. K., Semenchuk, P., & Priemé, A. (2015). Distinct summer and winter bacterial communities in the active layer of Svalbard permafrost revealed by DNA- and RNA-based analyses. *Frontiers in microbiology*, 6:399.
- Science, U. S. & Administration, E. (1975). *Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. Number 436. Soil Conservation Service, US Department of Agriculture.
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3):379–423.
- Shannon, C. E. & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication – University of Illinois Press. *Urbana*, 117.
- Shaxson, F. & Barber, R. (2008). *Optimización de la humedad del suelo para la producción vegetal - El significado de la porosidad del suelo*, volume 79. Food & Agriculture Organisation.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Shober, A. L., Stehouwer, R. C., & Macneal, K. E. (2003). On-farm assessment of biosolids effects on soil and crop tissue quality. *Journal of Environmental Quality*, 32(5):1873–1880.
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3-4):339–353.
- Smeltzer, M., Hart, M., & Iandolo, J. (1992). A quantitative assay for lipase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:2815–2819.
- Spadaro, D., Pellegrino, C., Gribaldi, A., & Gullino, M. L. (2011). Development of SCAR primers for the detection of the postharvest pathogens of kiwifruit and pome fruit *Cadophora luteo-olivacea* and *C. malorum*. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(3):430–441.
- Spagnolo, A., Marchi, G., Peduto, F., Phillips, A. J., & Surico, G. (2011). Detection of Botryosphaeriaceae species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *European Journal of Plant Pathology*, 129(3):485–500.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., *et al.* (2001). Visualization of n-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12):5761–5770.
- Stein, A., Gerstner, K., & Kreft, H. (2014). Environmental heterogeneity as a universal driver of species richness across taxa, biomes and spatial scales. *Ecology letters*, 17(7):866–880.
- Swędryńska, D. & Grześ, S. (2015). Microbiological parameters of soil under sugar beet as a response to the long-term application of different tillage systems. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(1):285–294.
- Tolosa-Almendros, V., Lerma, M., Castillo, P., Armengol, J., & Muñoz, R. (2016). Identificación de especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* en plantas de vid con síntomas de decaimiento. In *XVIII Congress of the Spanish Plant Pathology Society*.
- Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570):1064–1066.

- 
- Tran-Dinh, N., Kennedy, I., Bui, T., & Carter, D. (2009). Survey of vietnamese peanuts, corn and soil for the presence of *aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 168(5):257–268.
- Van Leeuwen, C. & Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17(1):1–10.
- Venter, Z. S., Jacobs, K., & Hawkins, H. J. (2016). The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. *Pedobiologia*, 59(4):215–223.
- Vicente, J., Alonso, A., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2020). Specific and sensitive PCR detection of *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. *Crop Protection*, page 105140.
- Wang, W., Dalal, R., Moody, P., & Smith, C. (2003). Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(2):273–284.
- Wardle, D. & Parkinson, D. (1990). Interactions between microclimatic variables and the soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 9(3):273–280.
- Weber, C. F., King, G. M., & Aho, K. (2015). Relative abundance and composition within fungal orders differ between cheatgrass (*Bromus tectorum*) and sagebrush (*Artemisia tridentata*)-associated soils. *PloS one*, 10(1):e0117026.
- Woomer, P. L. (1994). *Most probable number counts*. Soil Science Society of America.
- Zimand, G., Elad, Y., & Chet, I. (1996). Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*, 86(11):1255–1260.

## BIBLIOGRAFÍA

---

# Anexos



## A. Difracción de rayos X: Difractogramas

Los difractogramas obtenidos mediante difracción de rayos X, tanto por el método del polvo como para la estimación de filosilicatos hinchables mediante agregados orientados a temperatura ambiente (AO), con tratamiento térmico (AO+TT) y en cápsula saturada con etilenglicol (AO+EG), se muestran a continuación:

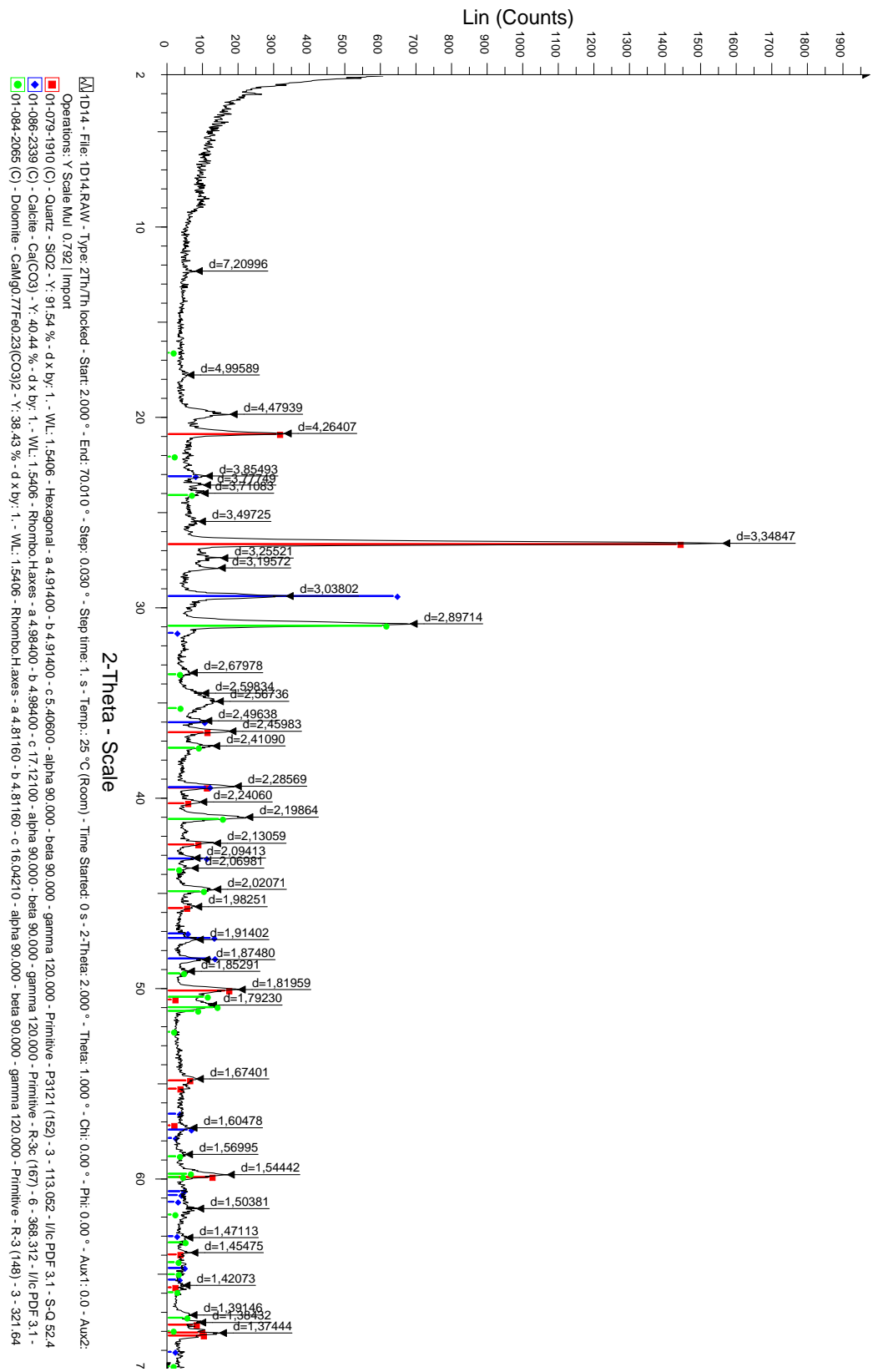


Figura A.5: PDC01

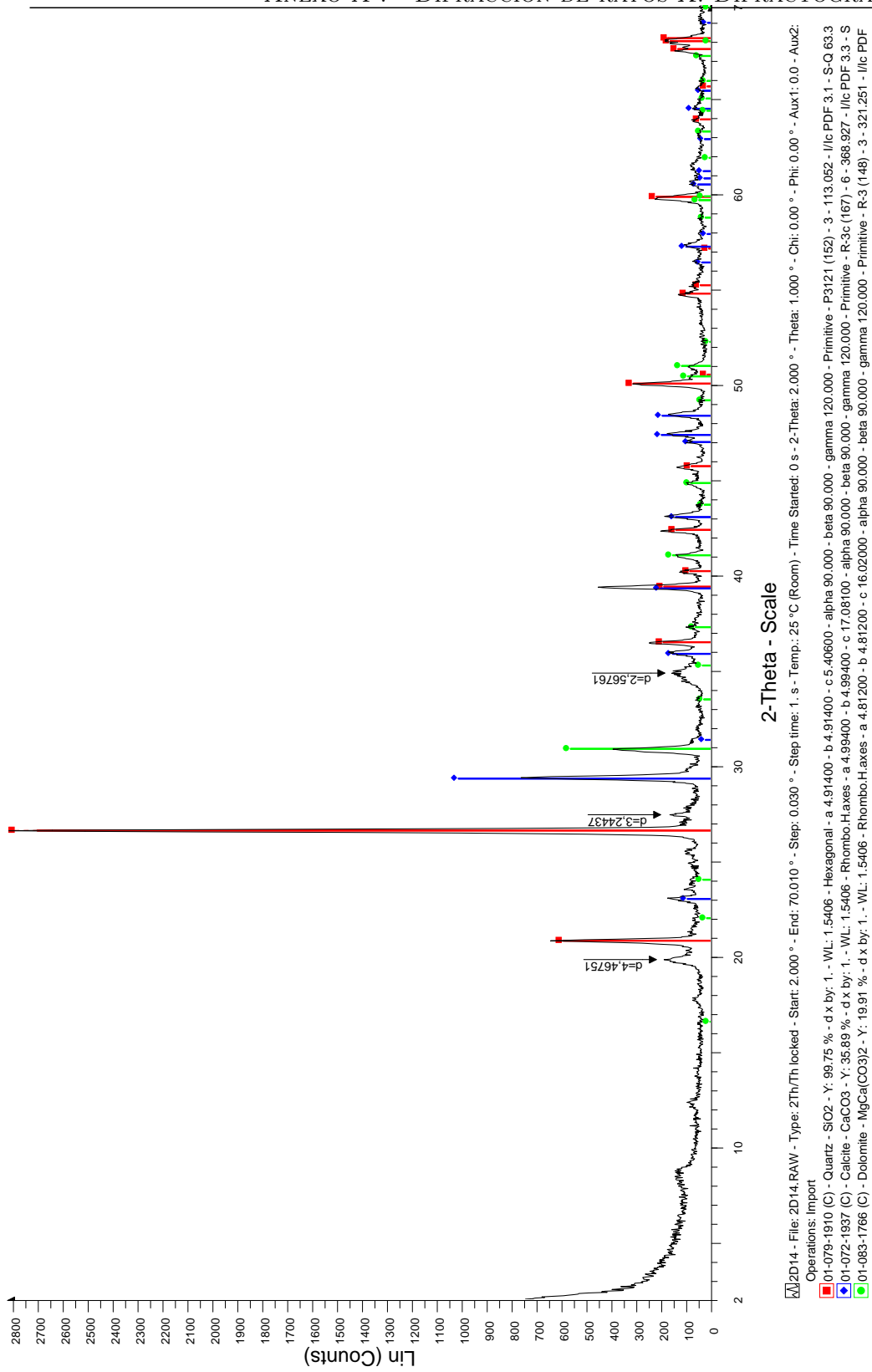


Figura A.6: PDC09

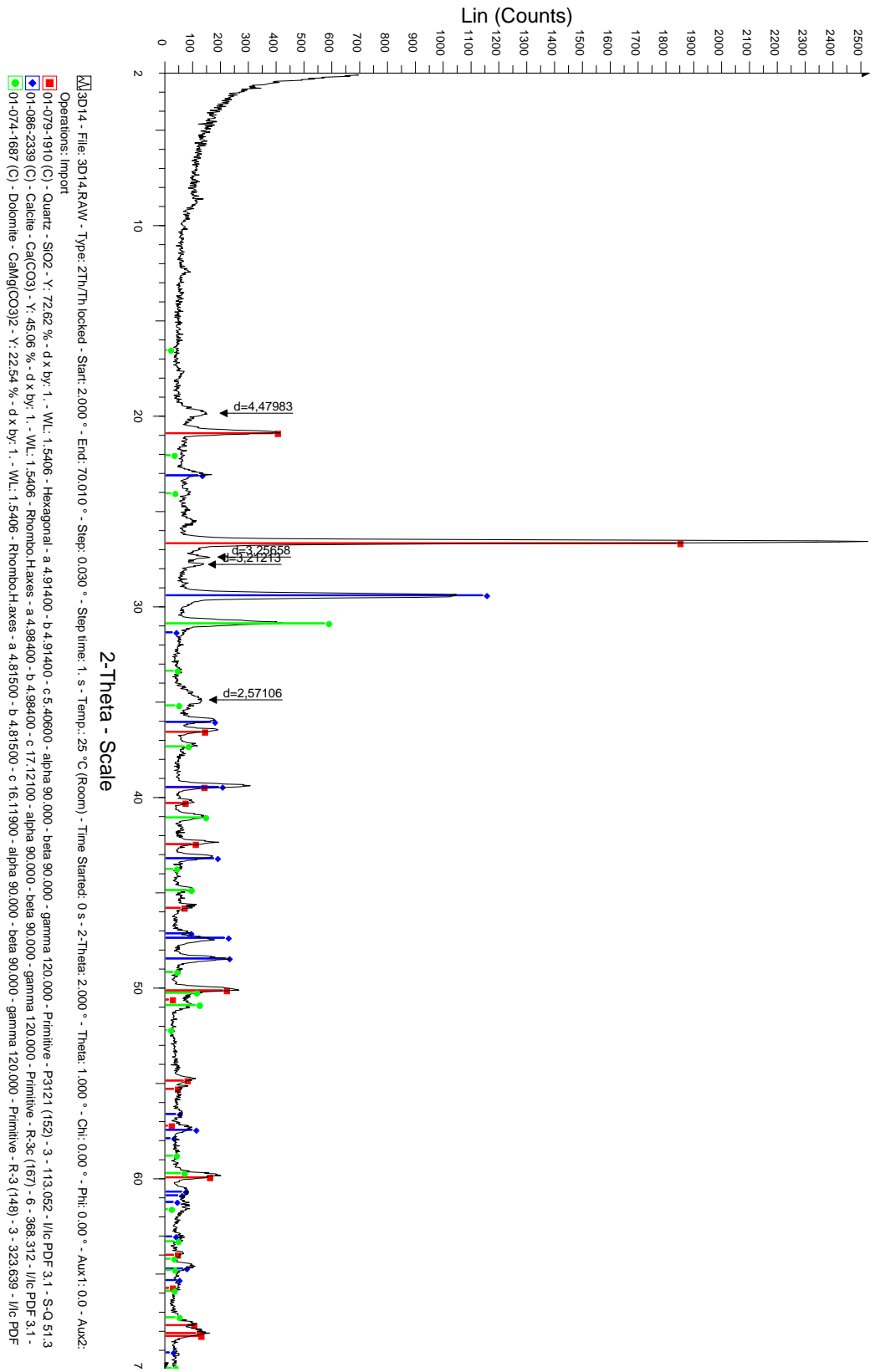


Figura A.7: PDC11

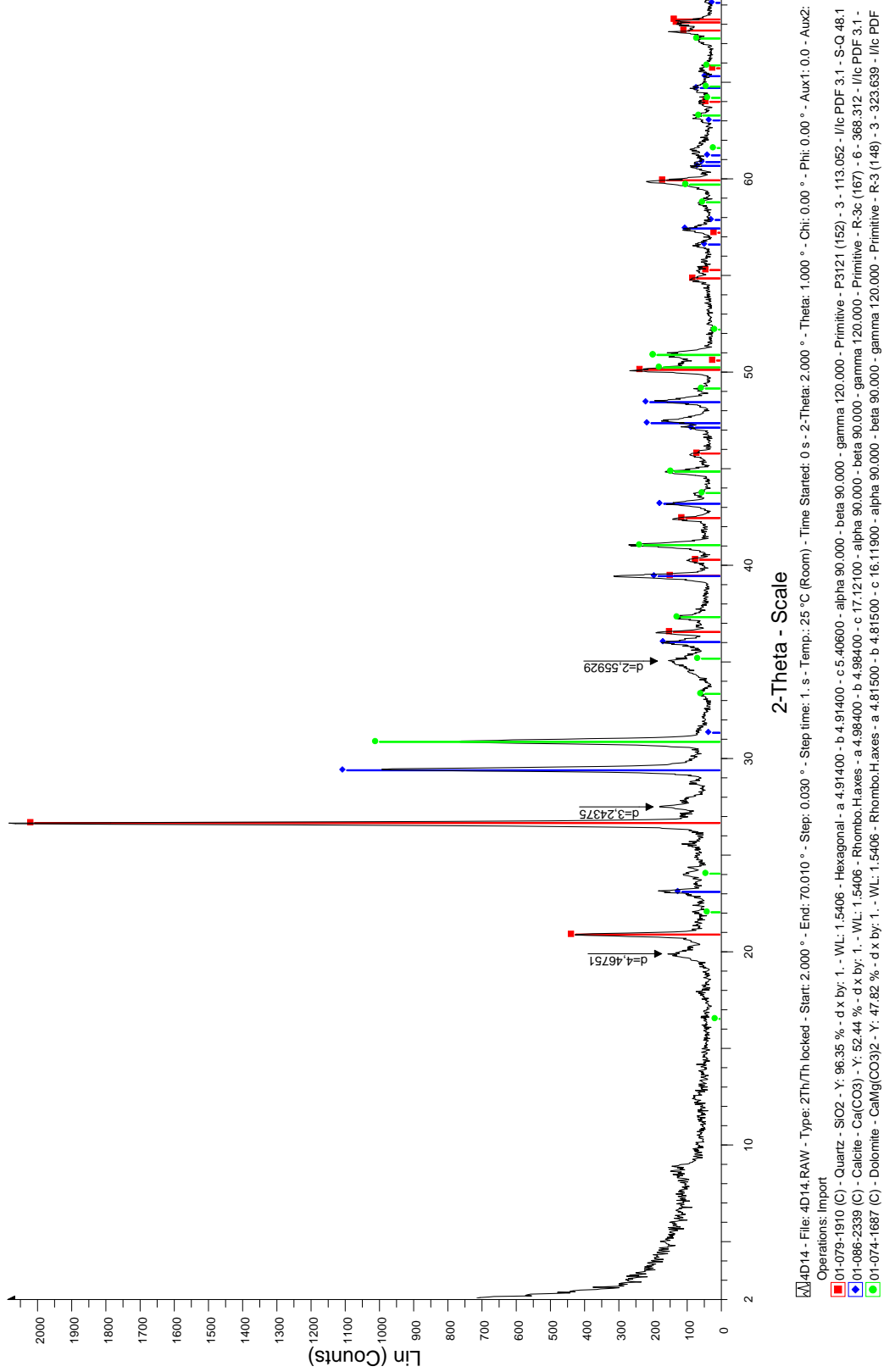


Figura A.8: PDC12

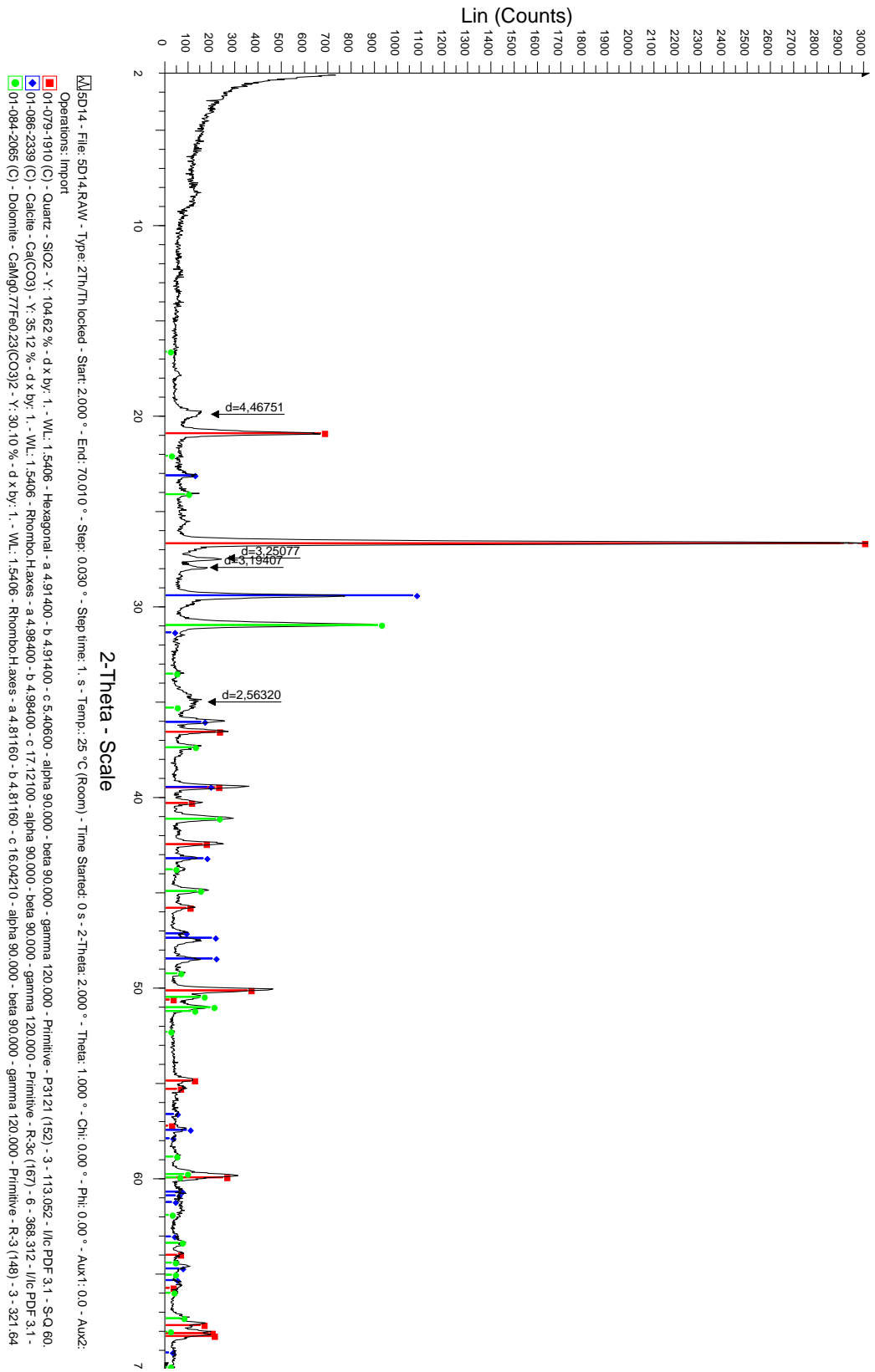


Figura A.9: PDC13

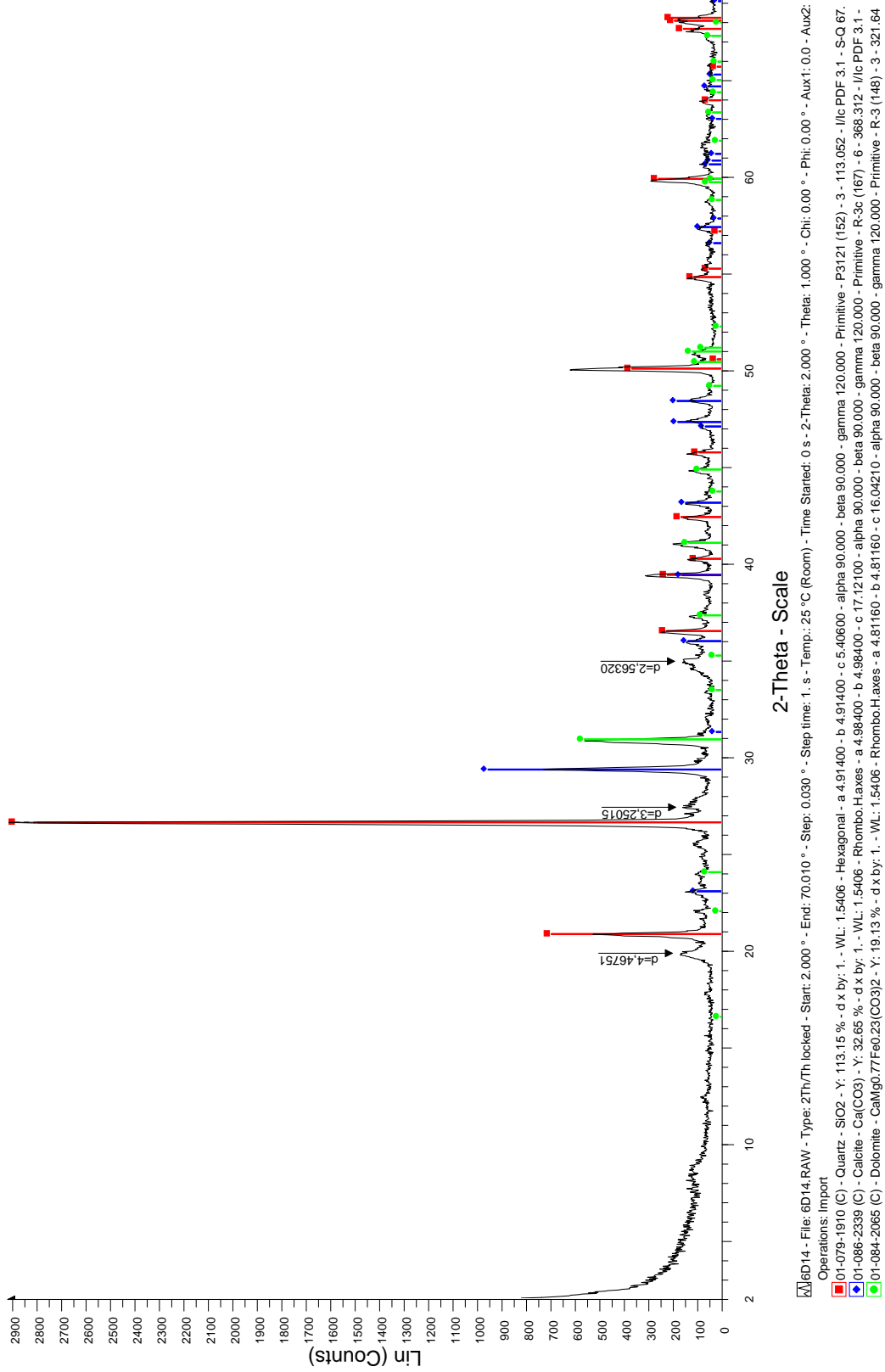


Figura A.10: PSTM02

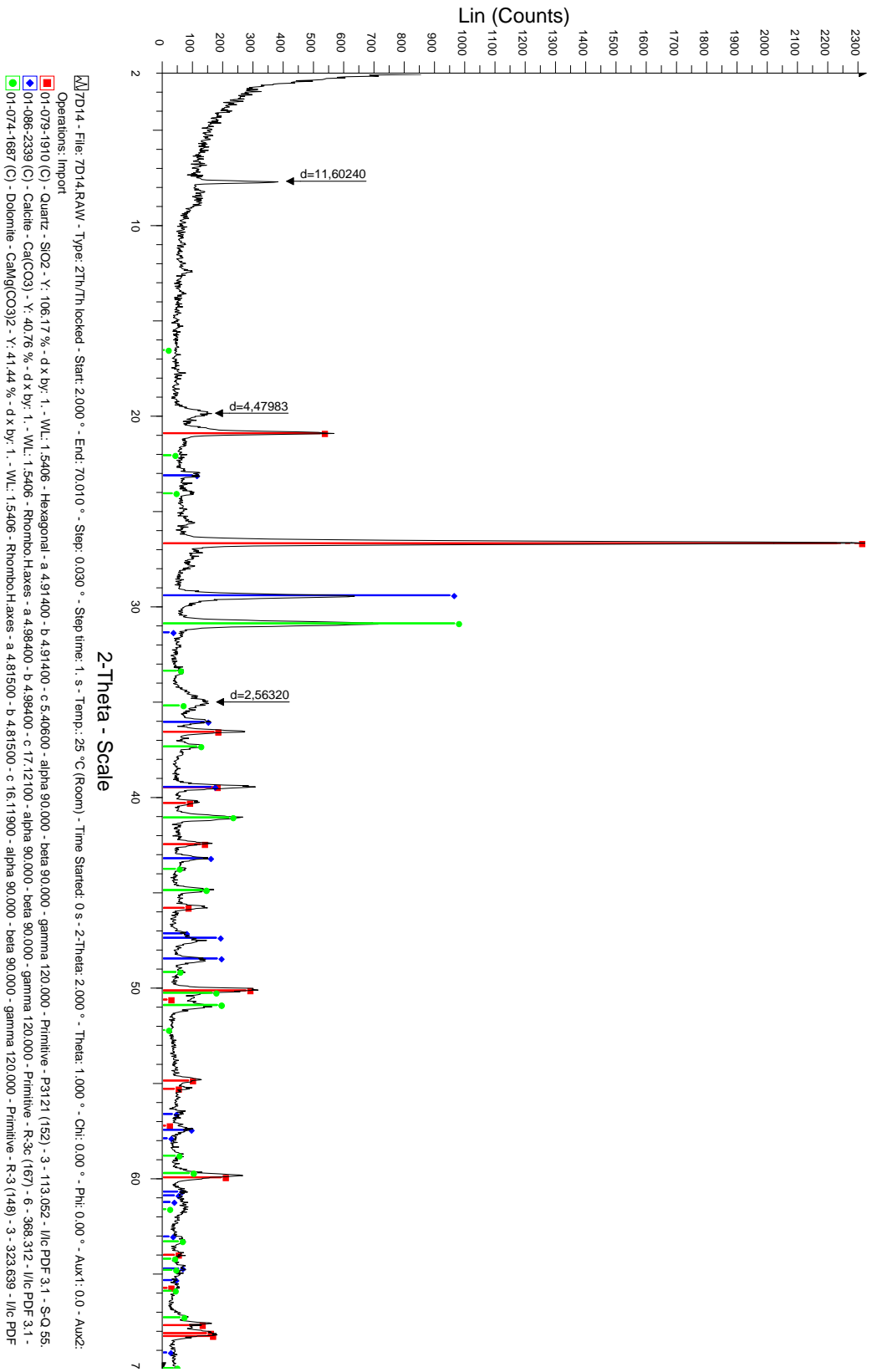


Figura A.11: PSTM05

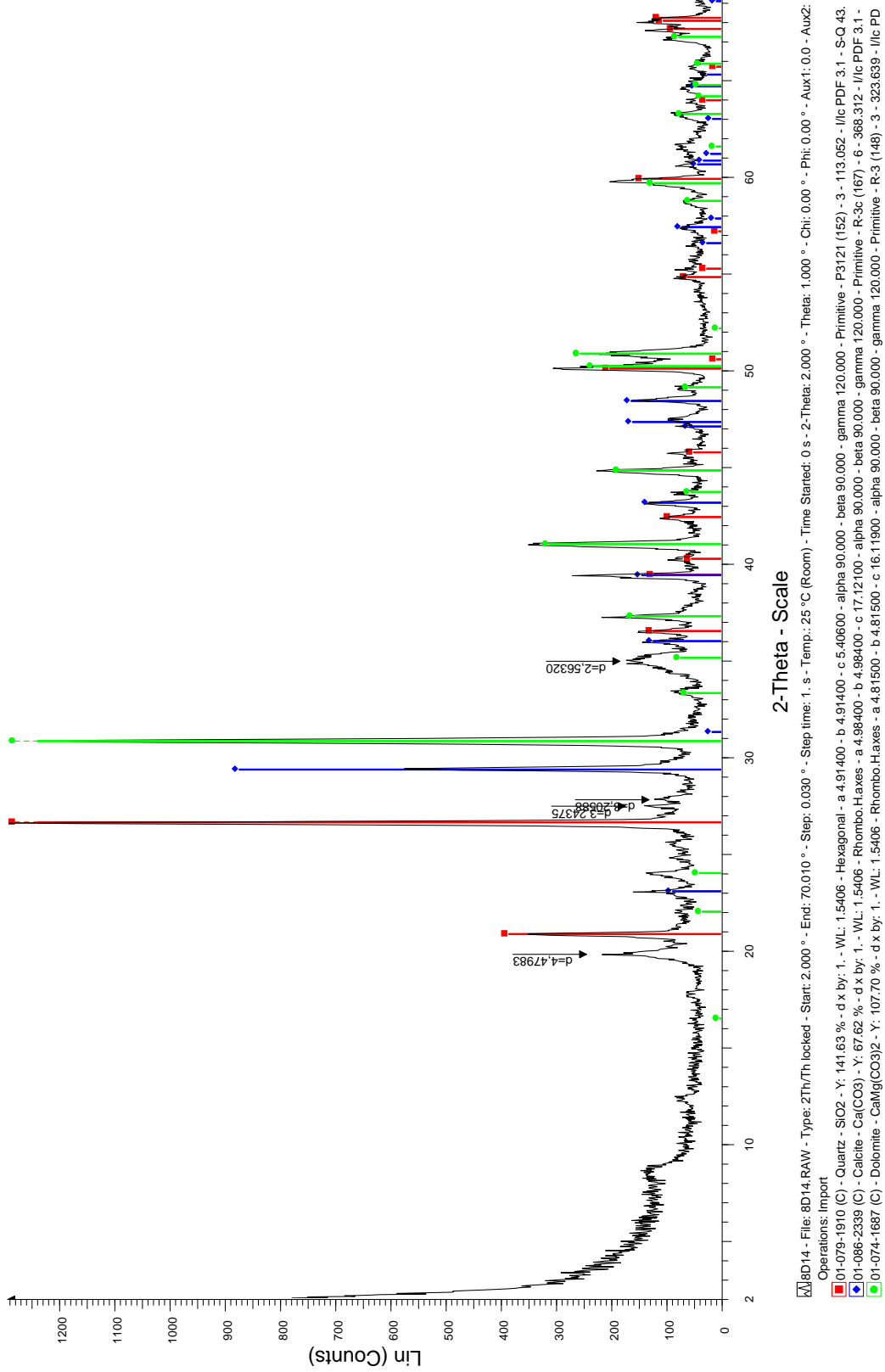


Figura A.12: PSTM08

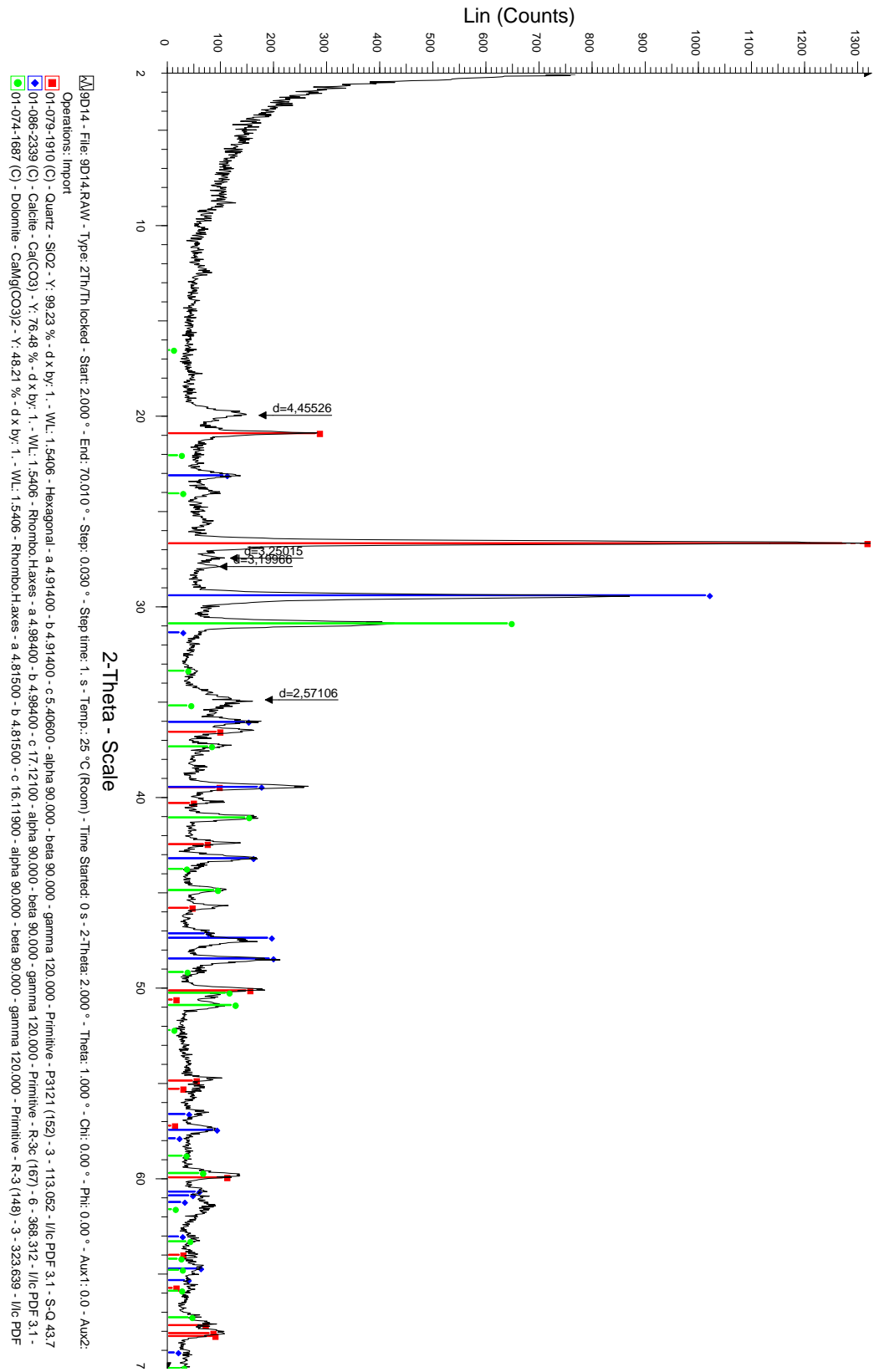


Figura A.13: T03

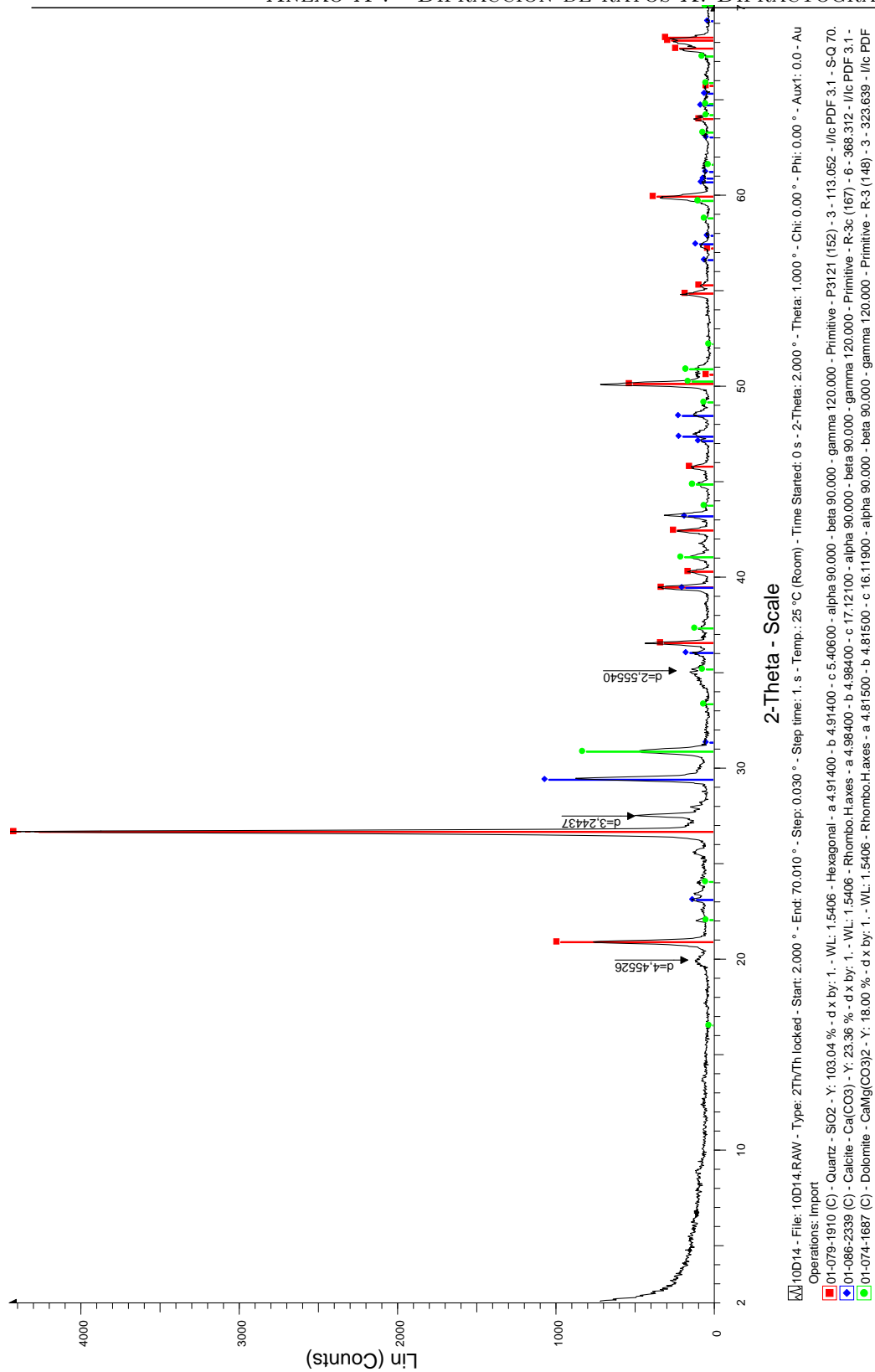


Figura A.14: V03

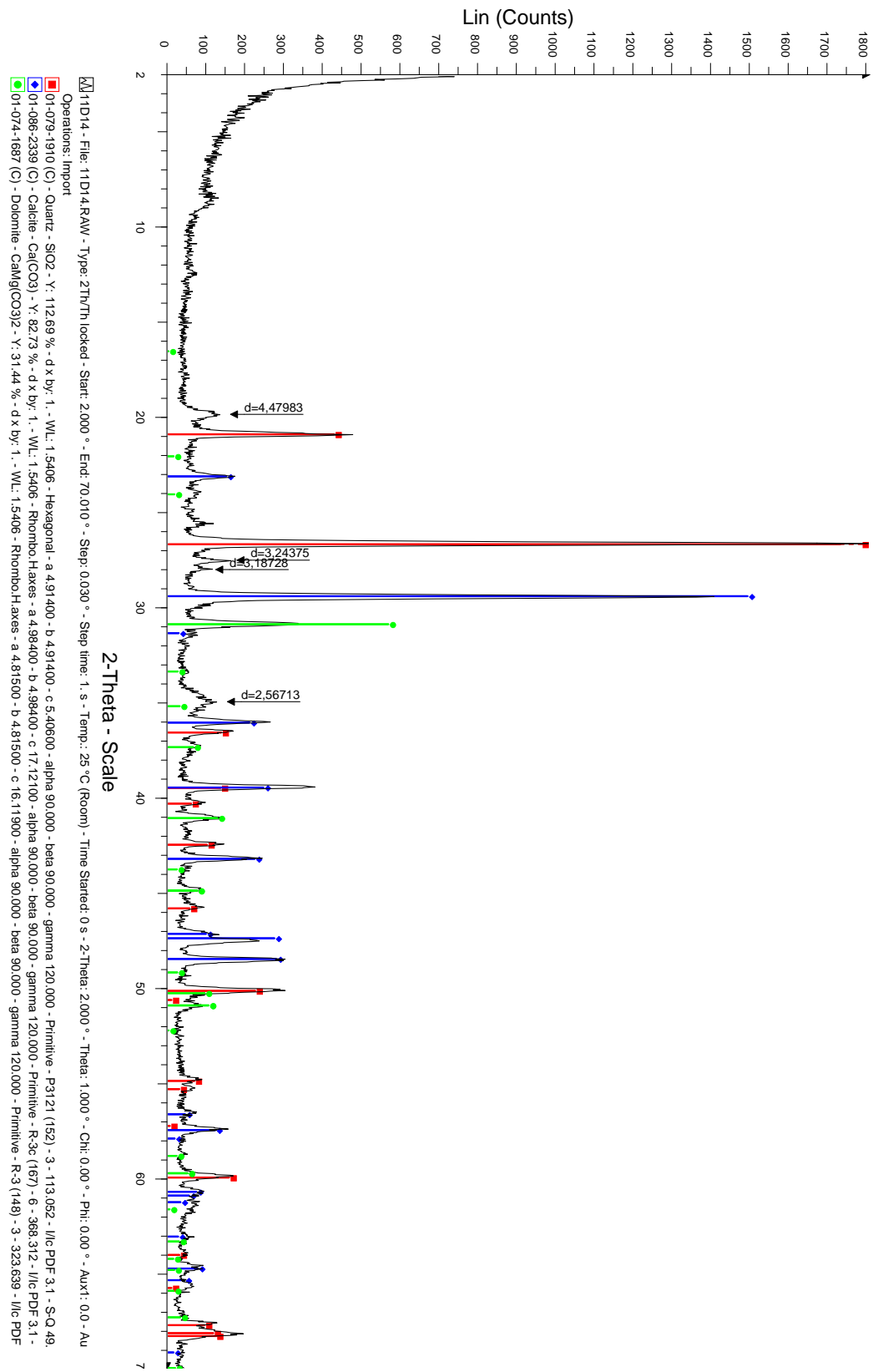


Figura A.15: V06

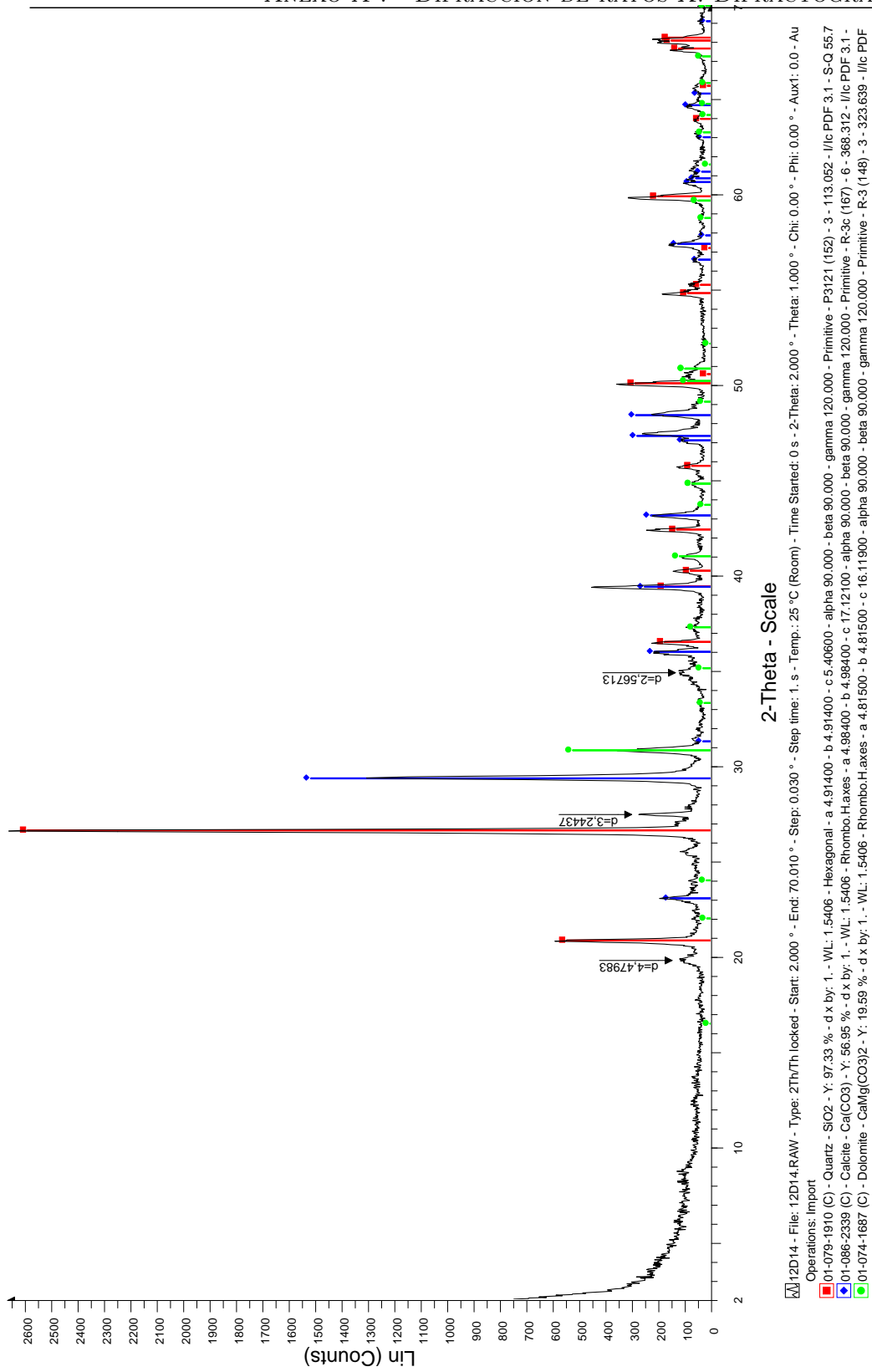


Figura A.16: V07

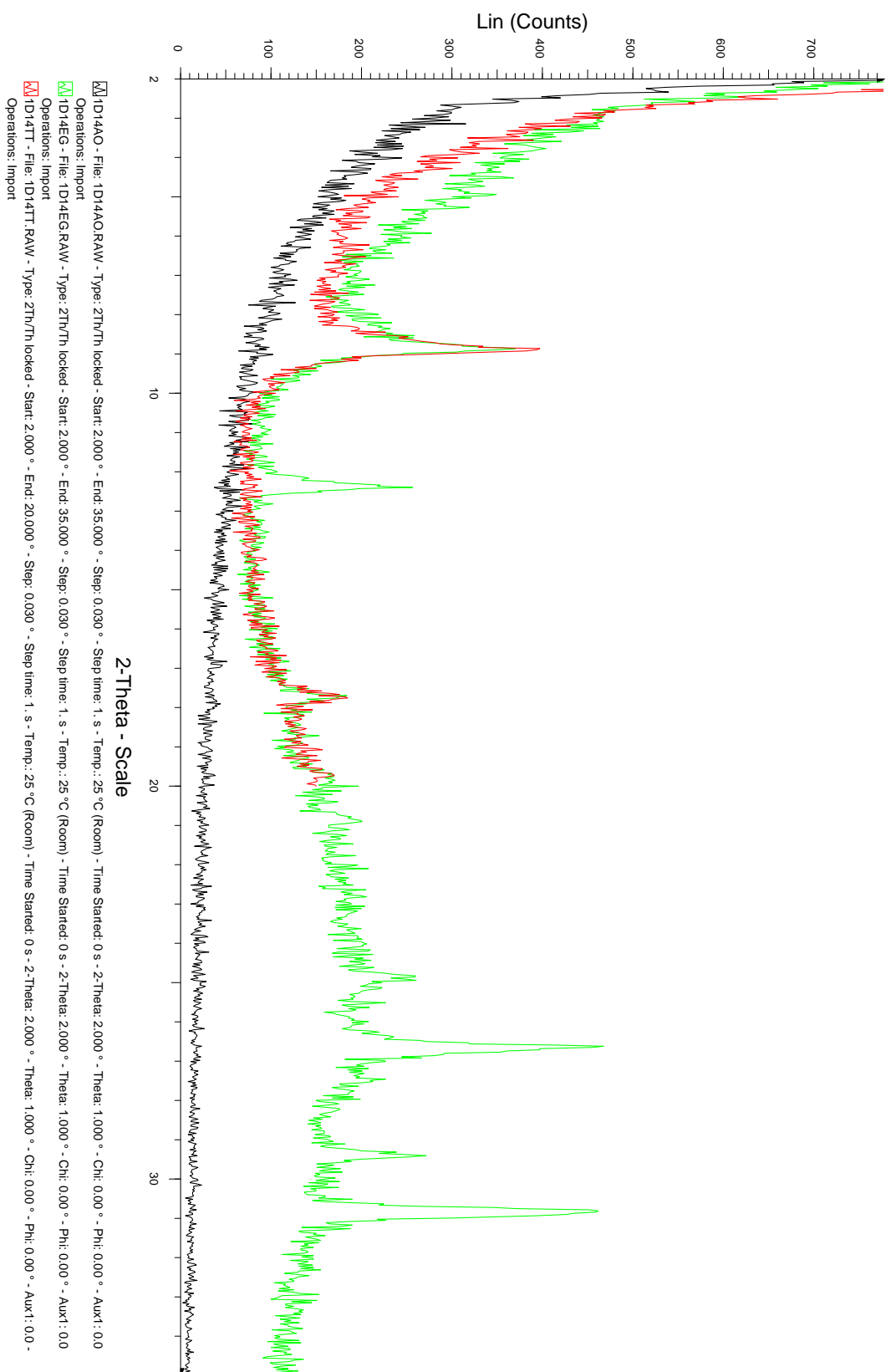


Figura A.17: PDC01

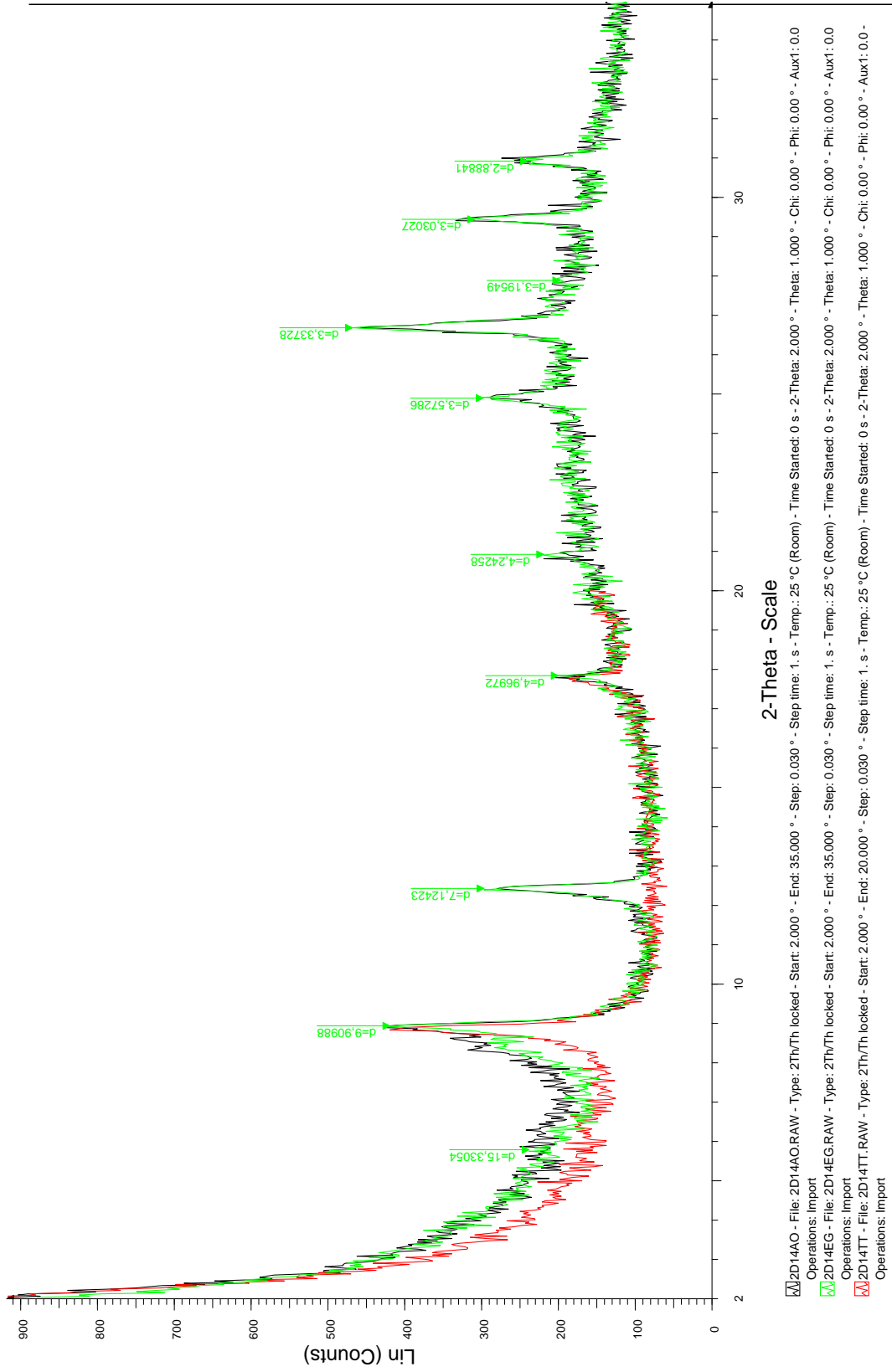


Figura A.18: PDC09

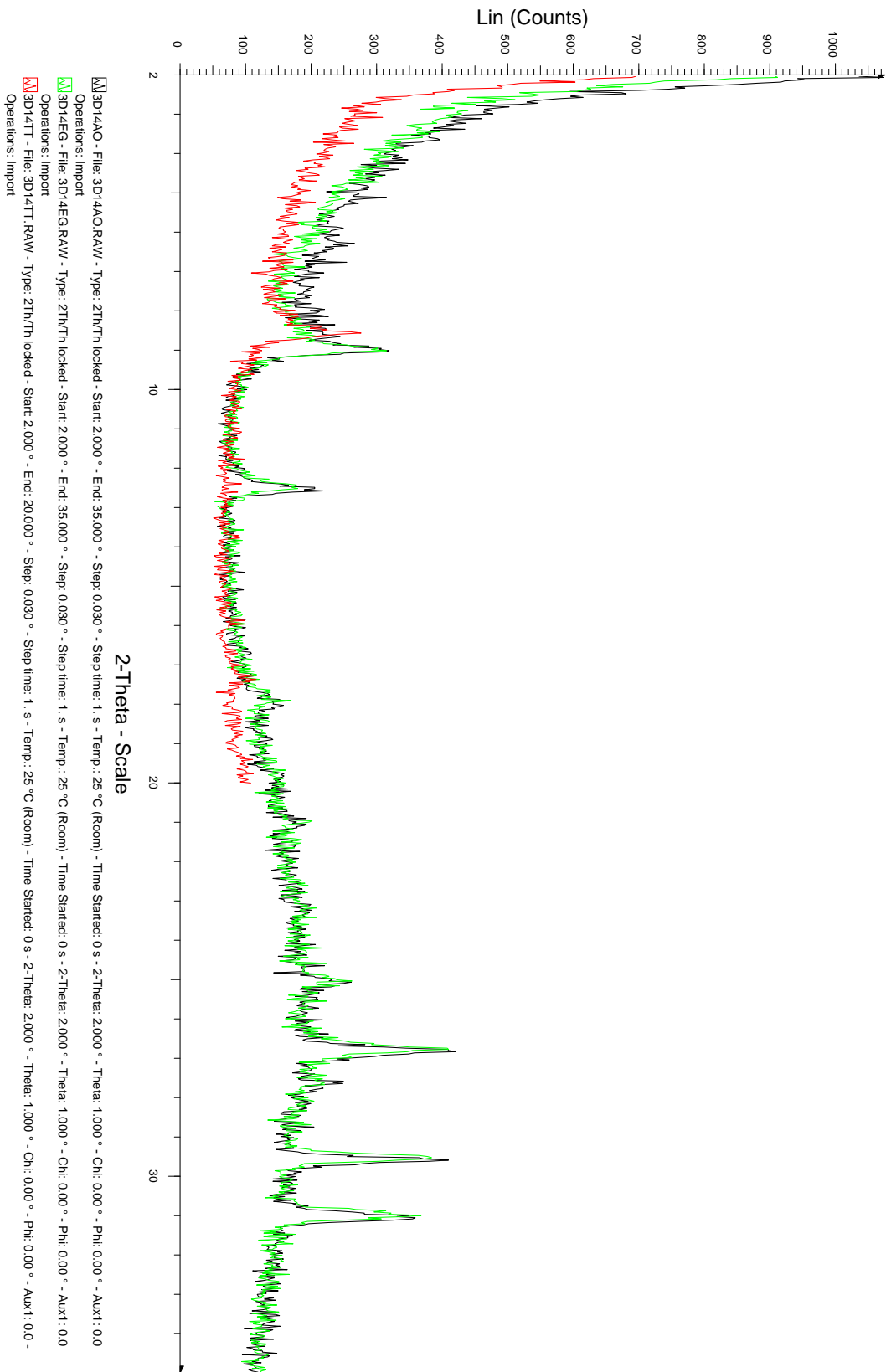


Figura A.19: PDC11

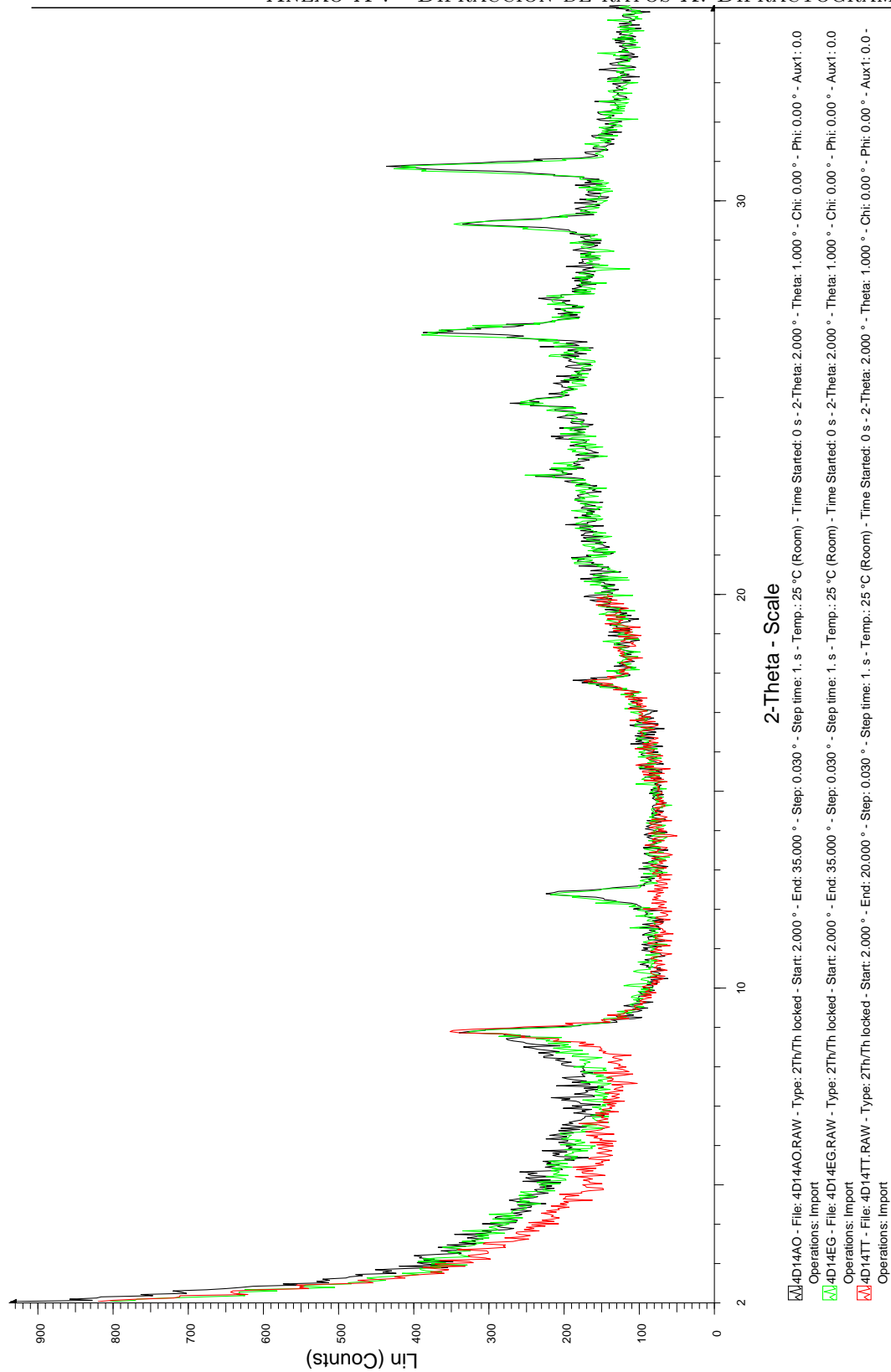


Figura A.20: PDC12

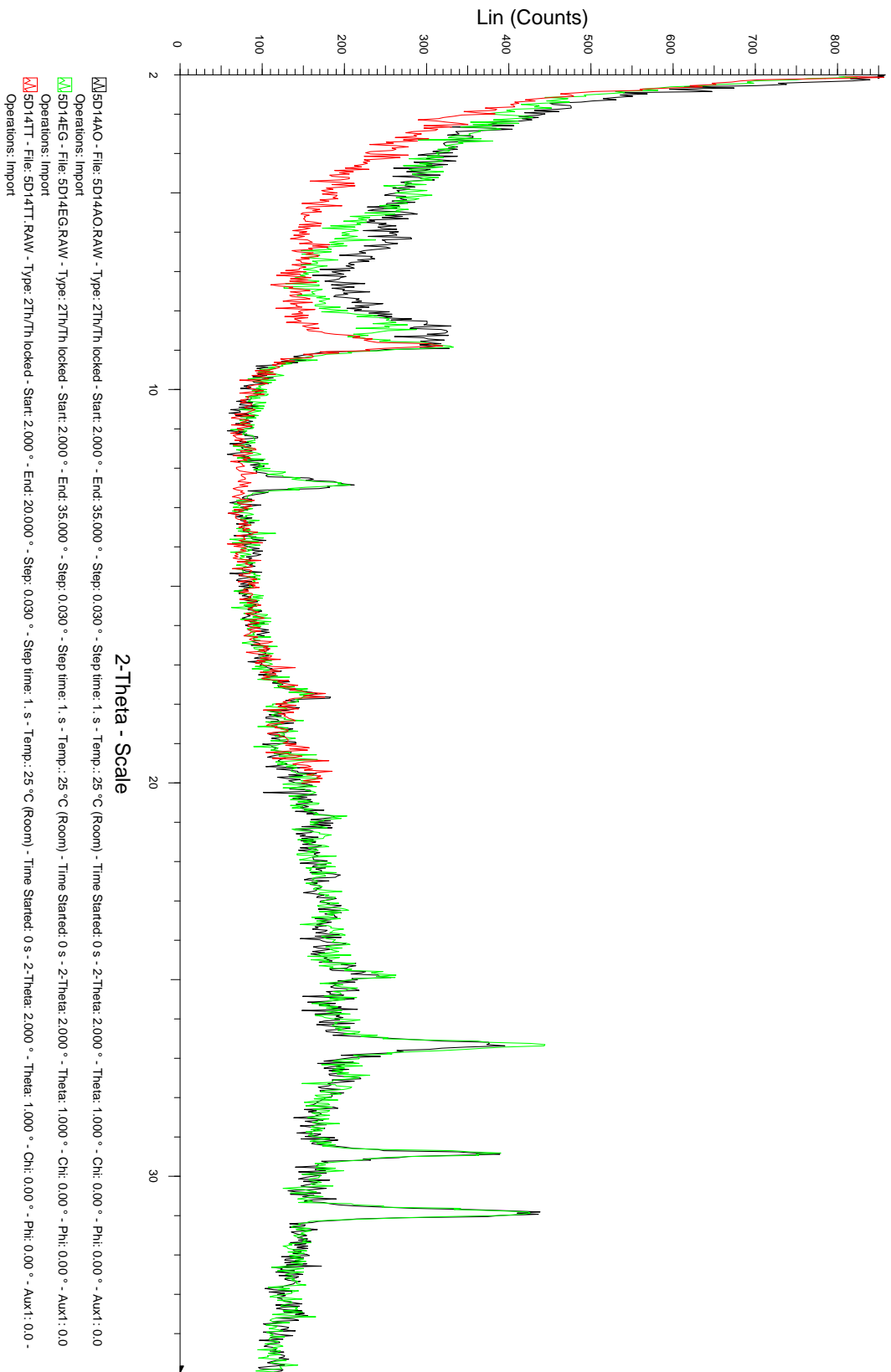


Figura A.21: PDC13

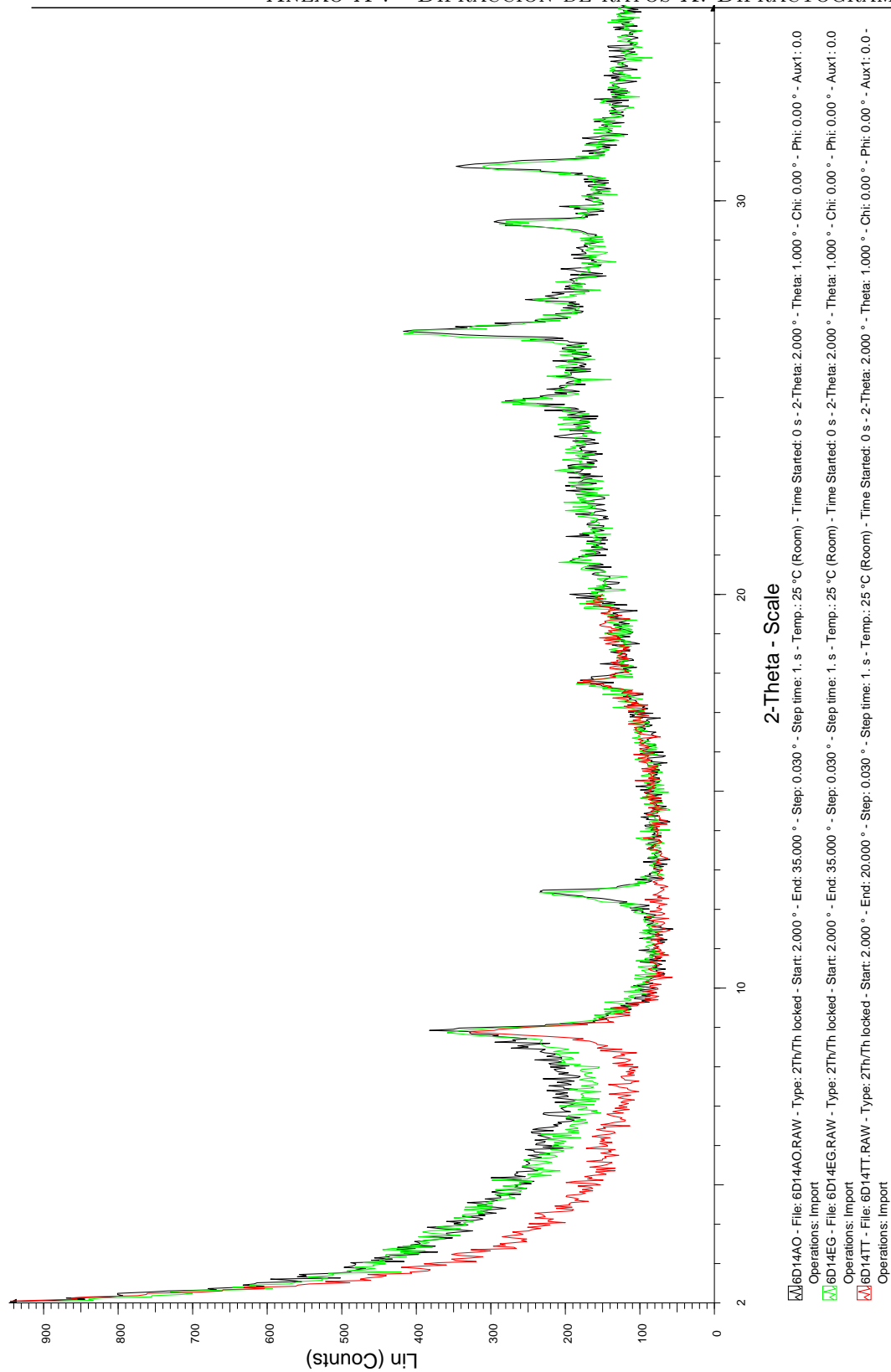


Figura A.22: PSTM02

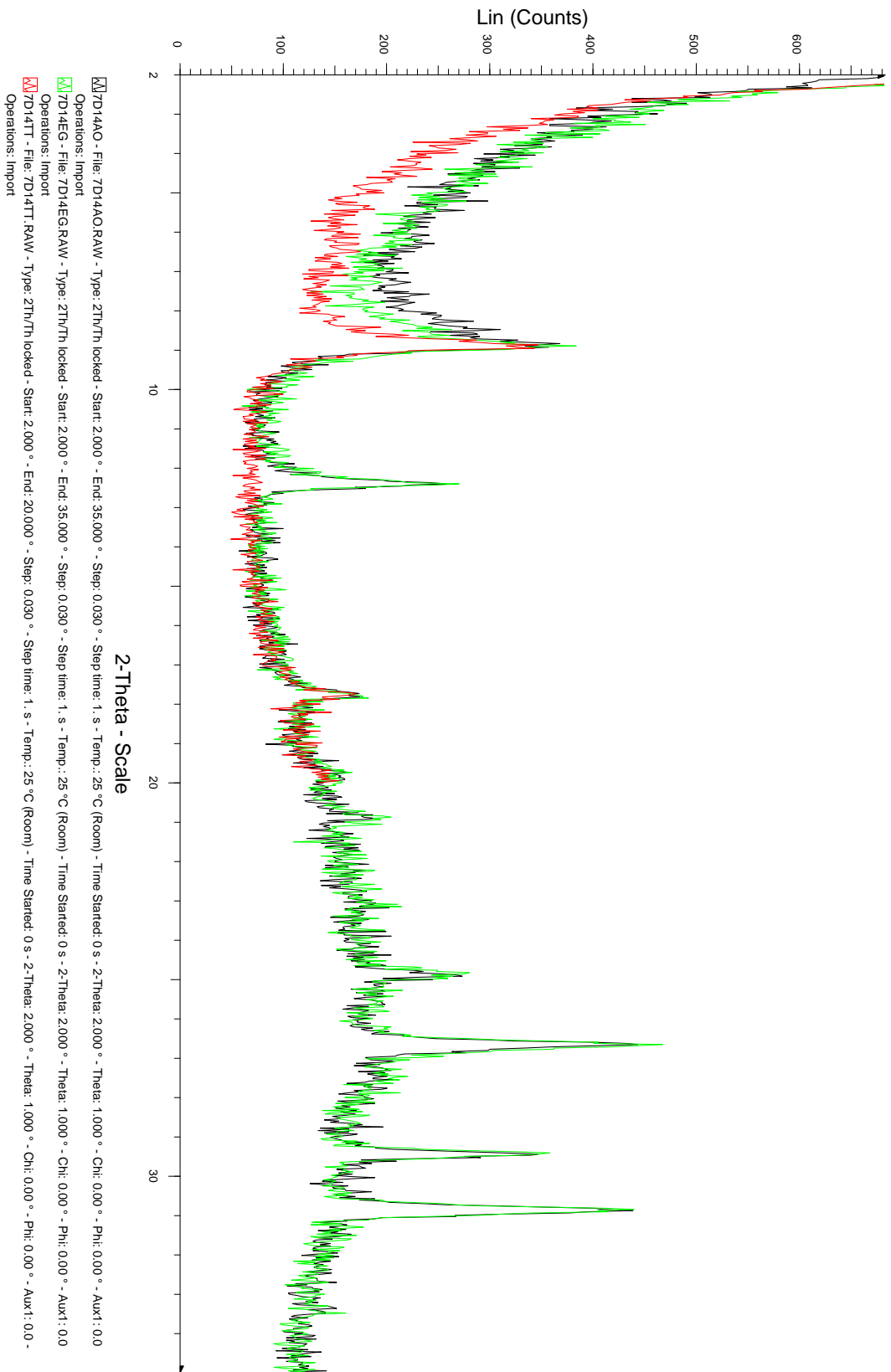


Figura A.23: PSTMO5

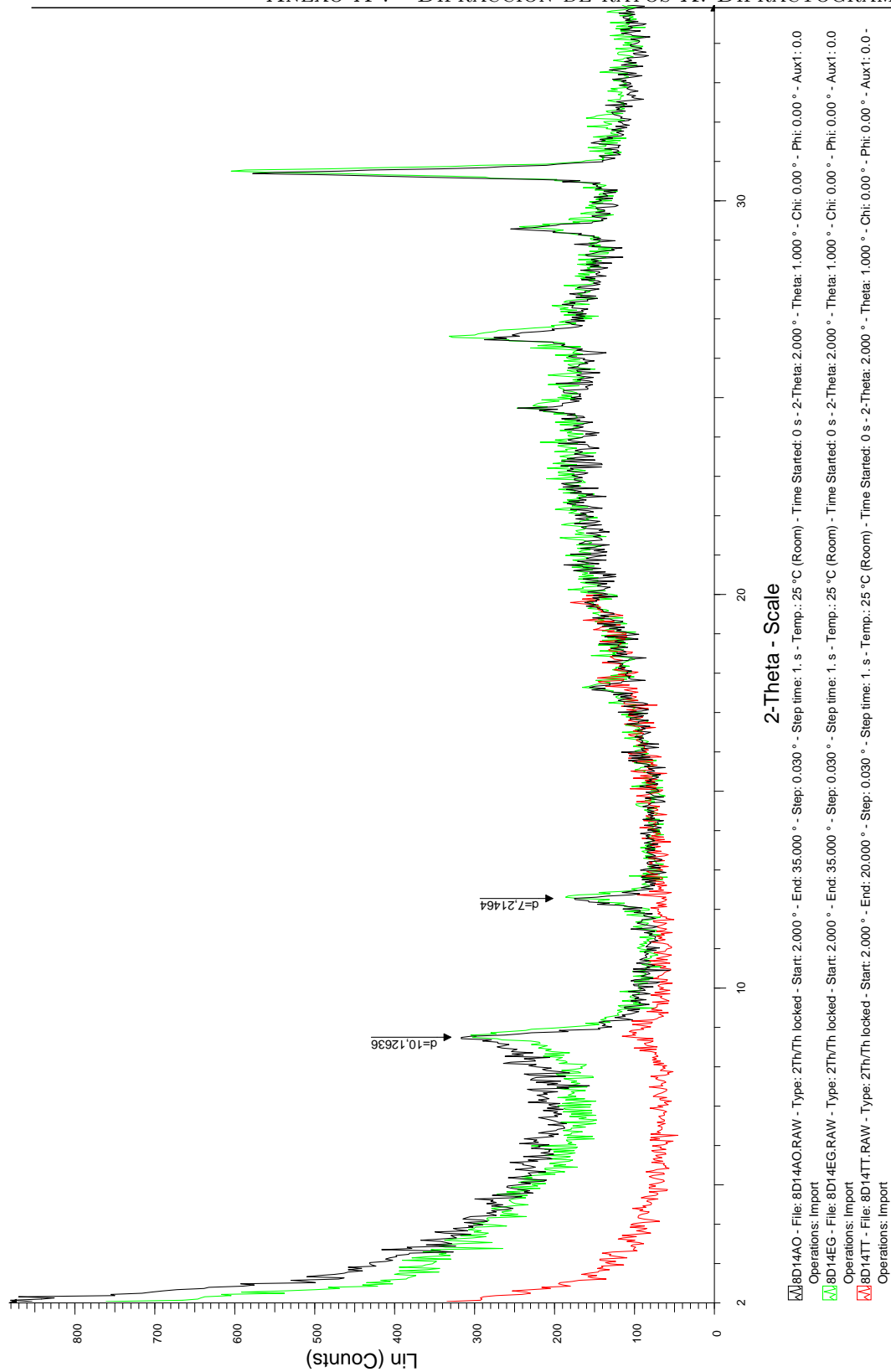


Figura A.24: PSTM08

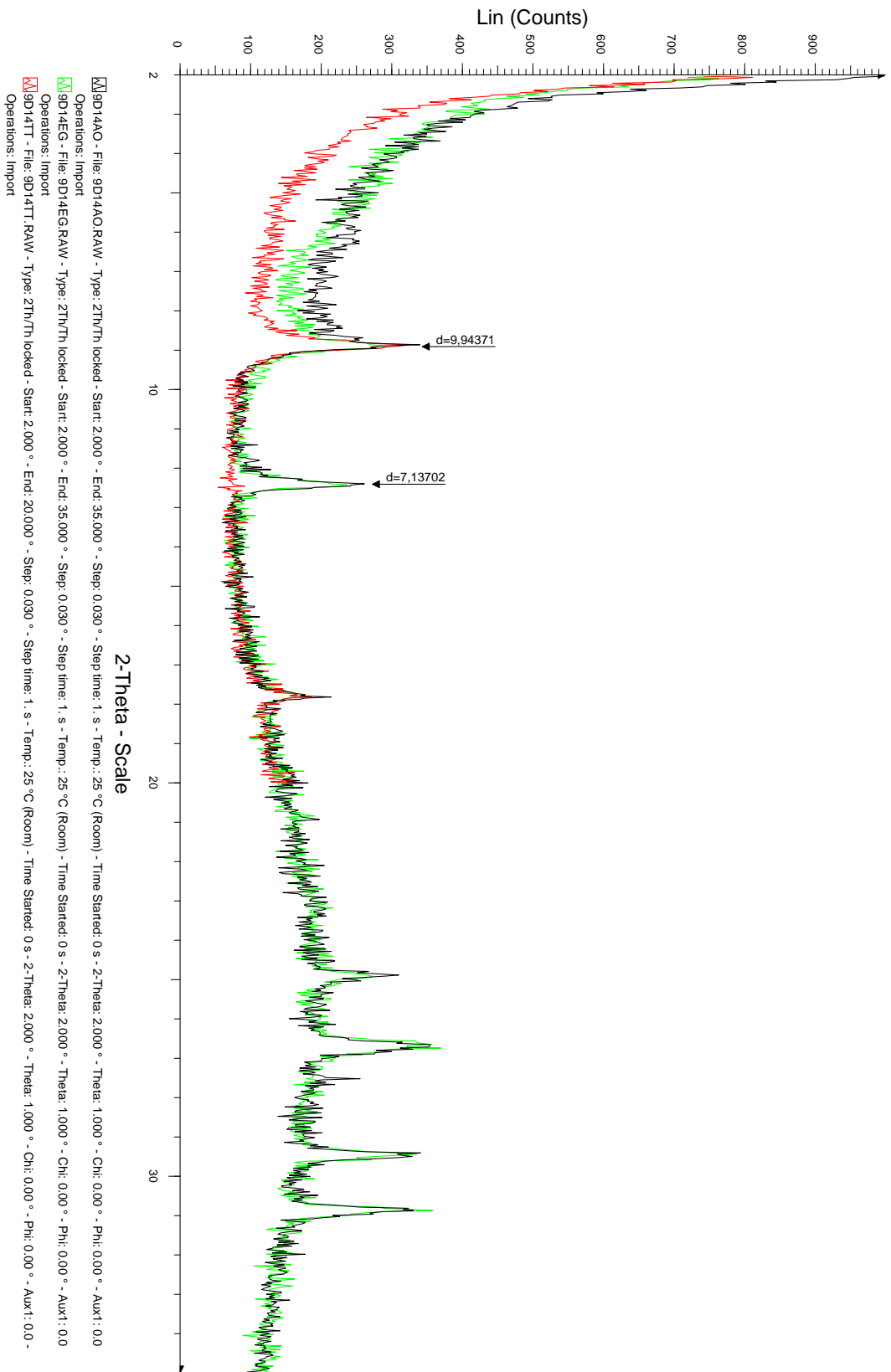


Figura A.25: T03

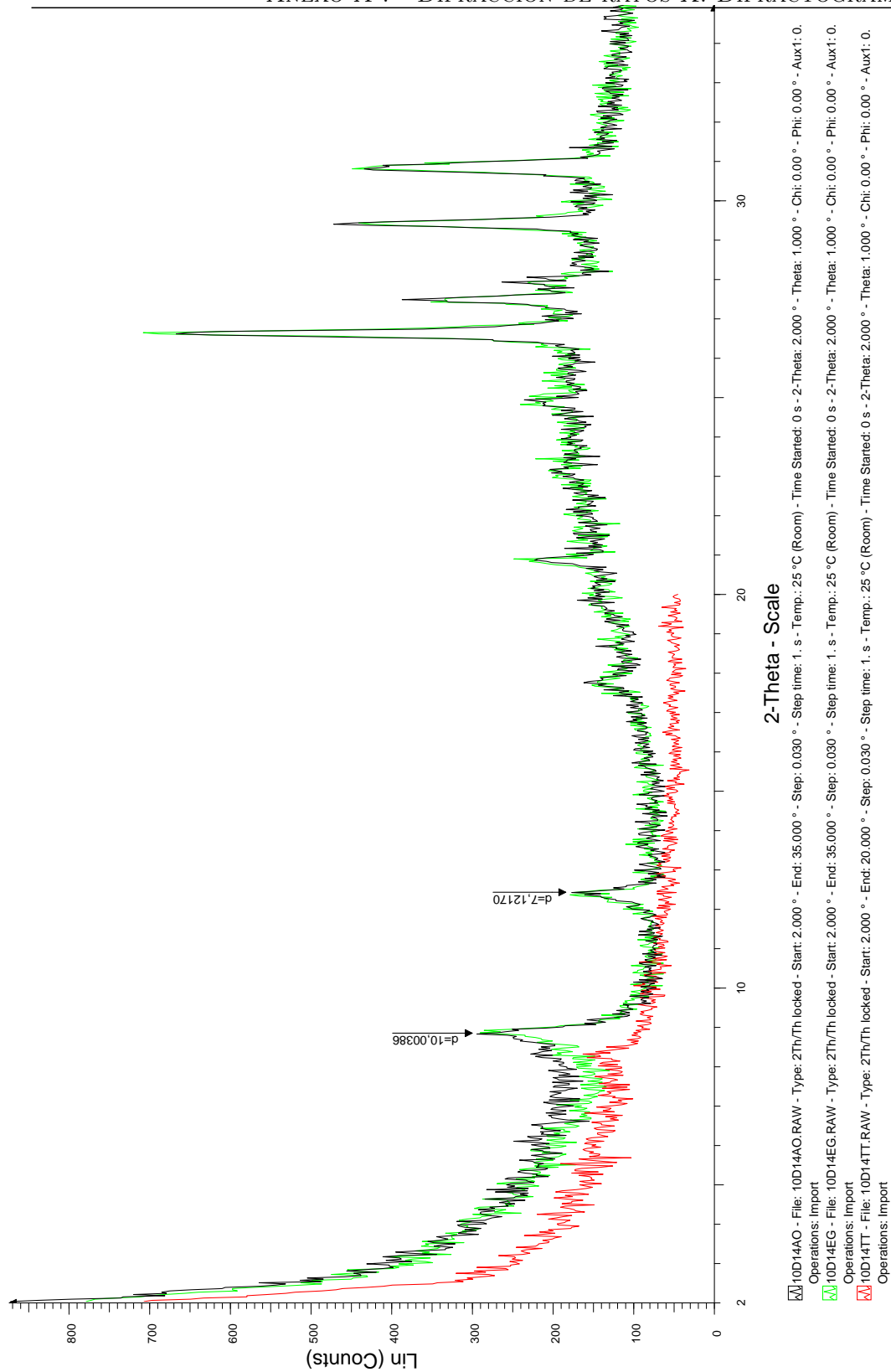


Figura A.26: V03

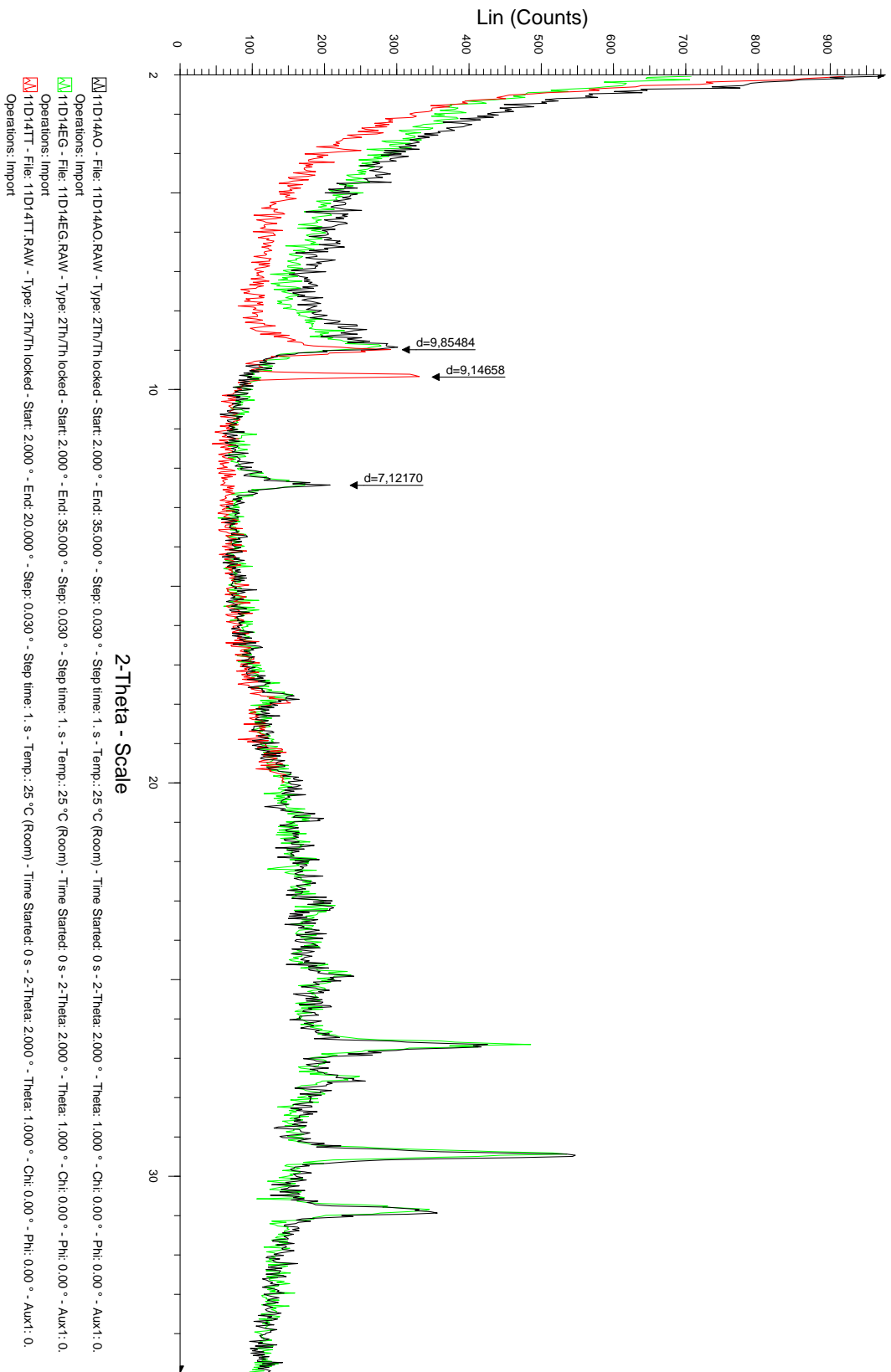


Figura A.27: V06

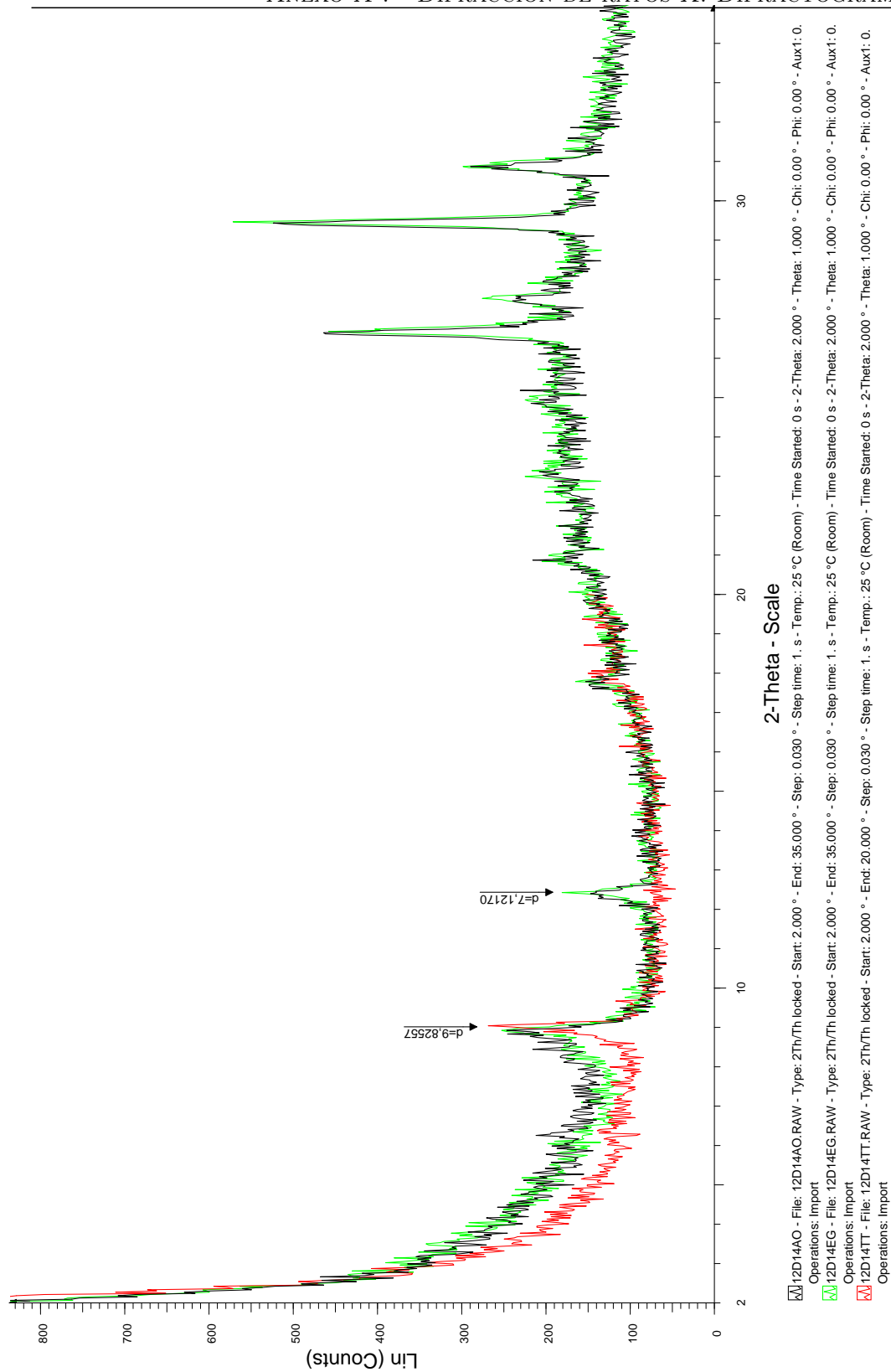


Figura A.28: V07



**B. Código fuente en Matlab<sup>®</sup> del programa de análisis DGGE**

```

% MATLAB LANGUAGE PROGRAM.
% AIM:
%     - TO CROP SOIL IMAGES INTO THEIR CORRESPONDING LANES.
%     - TO SAVE THE LANES AS SEPARATE IMAGES IN THEIR OWN DIRECTORIES
%       (CREATED BEFORE)
%
% =====

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS')

fprintf('ESTOY EN PRIMER DIRECTORIO');

d=dir(pwd);
length(d);

for i=3:length(d);
    fprintf('ESTOY EN PRIMER BUCLE FOR');

    if(d(i).isdir);

        cd(d(i).name);
        nombreDirectorio=d(i).name
        fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

        % SENTENCES TO GET THE LIST OF FILES OF THE CURRENT DIRECTORY.
        listaArchivos=dir;
        longitudlistaArchivos=length(listaArchivos);

        for j=3:longitudlistaArchivos;
            listaArchivos(j);

            % SENTENCES TO SHOW THE FILE NAMES ASSOCIATED TO THE IMAGES
            nombreArchivo1=listaArchivos(j).name;

            % SETENCES TO MANIPULATE THE NAMES OF THE INITIAL FILES AND TO GENERATE
            % THE NAMES OF THE FINAL FILES
            [restoToken, resto] = strtok(nombreArchivo1, '.');

            nombreArchivoSalida1=strcat('Carril1_',restoToken);
            nombreArchivoSalida1=strcat(nombreArchivoSalida1, '.jpg');

            nombreArchivoSalida2=strcat('Carril2_',restoToken);
            nombreArchivoSalida2=strcat(nombreArchivoSalida2, '.jpg');

            nombreArchivoSalida3=strcat('Carril3_',restoToken);
            nombreArchivoSalida3=strcat(nombreArchivoSalida3, '.jpg');

            nombreArchivoSalida4=strcat('Carril4_',restoToken);
            nombreArchivoSalida4=strcat(nombreArchivoSalida4, '.jpg');

            nombreArchivoSalida5=strcat('Carril5_',restoToken);
            nombreArchivoSalida5=strcat(nombreArchivoSalida5, '.jpg');

            nombreArchivoSalida6=strcat('Carril6_',restoToken);
            nombreArchivoSalida6=strcat(nombreArchivoSalida6, '.jpg');

            nombreArchivoSalida7=strcat('Carril7_',restoToken);

```

```

nombreArchivoSalida7=strcat(nombreArchivoSalida7, '.jpg');

nombreArchivoSalida8=strcat('Carril8_', restoToken);
nombreArchivoSalida8=strcat(nombreArchivoSalida8, '.jpg');

nombreArchivoSalida9=strcat('Carril9_', restoToken);
nombreArchivoSalida9=strcat(nombreArchivoSalida9, '.jpg');

nombreArchivoSalida10=strcat('Carril10_', restoToken);
nombreArchivoSalida10=strcat(nombreArchivoSalida10, '.jpg');

nombreArchivoSalida11=strcat('Carril11_', restoToken);
nombreArchivoSalida11=strcat(nombreArchivoSalida11, '.jpg');

nombreArchivoSalida12=strcat('Carril12_', restoToken);
nombreArchivoSalida12=strcat(nombreArchivoSalida12, '.jpg');

nombreNuevoDirectorio=strcat('CARRILES_RECORTADOS__', restoToken);
nombreNuevoDirectorio=strcat(nombreNuevoDirectorio, '\');

rutaNuevaDirectorio=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);

% NAMES OF THE DIRECTORIES THAT WILL STORE THE IMAGES OF THE LANES: A DIRECTORY BY
LANE

nombreDirectorio1='CARRIL 1';
nombreDirectorio2='CARRIL 2';
nombreDirectorio3='CARRIL 3';
nombreDirectorio4='CARRIL 4';
nombreDirectorio5='CARRIL 5';
nombreDirectorio6='CARRIL 6';
nombreDirectorio7='CARRIL 7';
nombreDirectorio8='CARRIL 8';
nombreDirectorio9='CARRIL 9';
nombreDirectorio10='CARRIL 10';
nombreDirectorio11='CARRIL 11';
nombreDirectorio12='CARRIL 12';

rutaNuevaDirectorio1=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio1=strcat(rutaNuevaDirectorio1, nombreDirectorio1);

rutaNuevaDirectorio2=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio2=strcat(rutaNuevaDirectorio2, nombreDirectorio2);

rutaNuevaDirectorio3=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio3=strcat(rutaNuevaDirectorio3, nombreDirectorio3);

rutaNuevaDirectorio4=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio4=strcat(rutaNuevaDirectorio4, nombreDirectorio4);

rutaNuevaDirectorio5=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio5=strcat(rutaNuevaDirectorio5, nombreDirectorio5);

rutaNuevaDirectorio6=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio6=strcat(rutaNuevaDirectorio6, nombreDirectorio6);

rutaNuevaDirectorio7=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\', nombreNuevoDirectorio);

```

```

rutaNuevaDirectorio7=strcat(rutaNuevaDirectorio7,nombreDirectorio7);

rutaNuevaDirectorio8=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\',nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio8=strcat(rutaNuevaDirectorio8,nombreDirectorio8);

rutaNuevaDirectorio9=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\',nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio9=strcat(rutaNuevaDirectorio9,nombreDirectorio9);

rutaNuevaDirectorio10=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA
INTENSIDADES PRUEBA\',nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio10=strcat(rutaNuevaDirectorio10,nombreDirectorio10);

rutaNuevaDirectorio11=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA
INTENSIDADES PRUEBA\',nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio11=strcat(rutaNuevaDirectorio11,nombreDirectorio11);

rutaNuevaDirectorio12=strcat('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA
INTENSIDADES PRUEBA\',nombreNuevoDirectorio);
rutaNuevaDirectorio12=strcat(rutaNuevaDirectorio12,nombreDirectorio12);

% WE GET THE MATRIX ASSOCIATED WITH THE IMAGE
imagenPrimera=imread(nombreArchivo1,'jpg');
imshow(imagenPrimera);

info = imfinfo(nombreArchivo1,'jpg')
pause;

% GRAPHICAL INPUT FROM MOUSE: WE IDENTIFY THE LANE BY
% POSITIONING THE CURSOR WITH THE MOUSE IN THE SELECCTED
% POINTS
[x,y]=ginput(12)
[xfin, yfin]=ginput(12);

numeroPuntosMedios=length(x);

for m=1:numeroPuntosMedios;
    posicionIzquierda(m)=x(m)-15;
    altura(m)=yfin(m)-y(m);
end;

% SENTENCES TO CROP THE INITIAL IMAGE INTO LANES AND TO SAVE THESE LANES AS SEPARATE
IMAGES

fprintf('MOSTRAMOS LA IMAGEN RECORTADA\n')
imagenCortada1=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(1) y(1) 20 altura(1)]);

imshow(imagenCortada1);

[SUCCESS] = mkdir ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES
PRUEBA\',nombreNuevoDirectorio);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

[SUCCESS1] = mkdir(nombreDirectorio1)

if (SUCCESS1==1);

    cd(rutaNuevaDirectorio1);

```

```

        imwrite(imagenCortada1,nombreArchivoSalida1);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;

end;

imagenCortada2=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(2) y(2) 20 altura(2)]);

imshow(imagenCortada2);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS2] = mkdir(nombreDirectorio2)
    if (SUCCESS2==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio2);

        imwrite(imagenCortada2,nombreArchivoSalida2);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;

end;

imagenCortada3=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(3) y(3) 20 altura(3)]);

imshow(imagenCortada3);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS3] = mkdir(nombreDirectorio3)
    if (SUCCESS3==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio3);

        imwrite(imagenCortada3,nombreArchivoSalida3);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada4=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(4) y(4) 20 altura(4)]);

imshow(imagenCortada4);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS4] = mkdir(nombreDirectorio4)
    if (SUCCESS4==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio4);

        imwrite(imagenCortada4,nombreArchivoSalida4);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;

end;

imagenCortada5=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(5) y(5) 20 altura(5)]);

```

```

imshow(imagenCortada5);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS5] = mkdir(nombreDirectorio5)
    if (SUCCESS5==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio5);

        imwrite(imagenCortada5,nombreArchivoSalida5);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada6=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(6) y(6) 20 altura(6)]);

imshow(imagenCortada6);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS6] = mkdir(nombreDirectorio6)
    if (SUCCESS6==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio6);

        imwrite(imagenCortada6,nombreArchivoSalida6);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada7=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(7) y(7) 20 altura(7)]);

imshow(imagenCortada7);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS7] = mkdir(nombreDirectorio7)
    if (SUCCESS7==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio7);

        imwrite(imagenCortada7,nombreArchivoSalida7);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada8=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(8) y(8) 20 altura(8)]);

imshow(imagenCortada8);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS8] = mkdir(nombreDirectorio8)
    if (SUCCESS8==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio8);

```

```

        imwrite(imagenCortada8,nombreArchivoSalida8);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada9=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(9) y(9) 20 altura(9)]);

imshow(imagenCortada9);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS9] = mkdir(nombreDirectorio9)
    if (SUCCESS9==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio9);

        imwrite(imagenCortada9,nombreArchivoSalida9);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada10=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(10) y(10) 20 altura(10)]);

imshow(imagenCortada10);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS10] = mkdir(nombreDirectorio10)
    if (SUCCESS10==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio10);

        imwrite(imagenCortada10,nombreArchivoSalida10);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada11=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(11) y(11) 20 altura(11)]);

imshow(imagenCortada11);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS11] = mkdir(nombreDirectorio11)
    if (SUCCESS11==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio11);

        imwrite(imagenCortada11,nombreArchivoSalida11);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;

imagenCortada12=imcrop(imagenPrimera,[posicionIzquierda(12) y(12) 20 altura(12)]);

```

```
imshow(imagenCortada12);

if(SUCCESS==1);
    cd(rutaNuevaDirectorio);

    [SUCCESS12] = mkdir(nombreDirectorio12)
    if (SUCCESS12==1);
        cd(rutaNuevaDirectorio12);

        imwrite(imagenCortada12,nombreArchivoSalida12);
        cd ..;
    end;
    cd ..;
    close;
end;
cd ..

end;
```

```
% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS')
```

```
end;
end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');
```



```

% SUM OF INTENSITY BY ROWS
sumaIntensidadesFilas=sum(imagenGris');
[numFilas numColumnas]=size(sumaIntensidadesFilas)

for i=1:numColumnas;

    fprintf(fid,'%4.0f %7.0f\n',i,sumaIntensidadesFilas(i));
    plot(i,sumaIntensidadesFilas(i),'*k','MarkerSize',3);
    xlabel('Posición Banda');
    xlim([0 numColumnas]);
    ylabel('Suma Intensidad');

    grid on;
    hold on;

end;
saveas(gcf,nombreNuevoArchivoSalida0,'jpg');
fclose(fid);

end;

end;
cd ..

end;

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

end;
end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');

```

```

% MATLAB LANGUAGE PROGRAM.
% AIM:
% - TO RESCALE THE POSITION AND THE SUM OF THE INTENSITY BY ROWS CORRESPONDING TO THE MATRIX
OF THE LANE IMAGES
% =====
=====

```

```

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

```

```

d=dir(pwd);
length(d);

```

```

for i=3:length(d);

```

```

    if(d(i).isdir);

```

```

        cd(d(i).name);
        nombreDirectorio=d(i).name;
        fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);
        d1=dir(pwd);
        length(d1)
        for j=3:length(d1);

```

```

            if(d1(j).isdir);

```

```

                cd(d1(j).name);
                nombreDirectorio=d1(j).name;
                fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);
                % SENTENCES TO GET THE LIST OF FILES OF THE CURRENT DIRECTORY.
                listaArchivos=dir;

```

```

                longitudlistaArchivos=length(listaArchivos); load
                SumaIntensidadFilas.txt
                numeroDatos=length(SumaIntensidadFilas)
                posicion=SumaIntensidadFilas(:,1);
                sumaIntensidad=SumaIntensidadFilas(:,2);

```

```

                % SENTENCES TO GET THE MAXIMUM OF SUM OF THE INTENSITIES
                maximaSumaIntensidades=max(sumaIntensidad);

```

```

                fid=fopen('SumaIntensidadFilasAmplificado.txt','a+');

```

```
for k=1:numeroDatos;

    nuevaPosicion(k)=posicion(k)*100;

sumaIntensidadNueva(k)=maximaSumaIntensidades-sumaIntensidad(k);
    fprintf(fid,'%4.0f %7.0f
%7.0f\n',nuevaPosicion(k),sumaIntensidad(k),sumaIntensidadNueva(k));
    end;
    fclose(fid);

end;
cd ..
end;

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')
end;
end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');
```

```

% MATLAB LANGUAGE PROGRAM.
% AIM:
%      -TO LOOK FOR THE PEAKS OF THE SPECTRUM
% =====

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

d=dir(pwd);
length(d);

for i=3:length(d);
    if(d(i).isdir);
        cd(d(i).name);
        nombreDirectorio=d(i).name;
        fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

        d1=dir(pwd);
        length(d1);

        for j=3:length(d1);
            if(d1(j).isdir);
                cd(d1(j).name);
                nombreDirectorio=d1(j).name;
                fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

                % SENTENCES TO GET THE LIST OF FILES OF THE CURRENT DIRECTORY.
                listaArchivos=dir;
                longitudlistaArchivos=length(listaArchivos);

                load SumaIntensidadFilasAmplificado.txt

                posicionBanda=SumaIntensidadFilasAmplificado(:,1);
                sumaIntensidad=SumaIntensidadFilasAmplificado(:,3);

                maximaSumaIntensidadesCorregidas=max(sumaIntensidad);

                numeroDatosSumaIntensidad=length(SumaIntensidadFilasAmplificado)

                % RULE TO CUT THE PEAKS OF THE SPECTRUM:  A SELECTED
                % PERCENTAGE OF THE MAXIMUM OF THE INTENSITY SUM

                corteAlturaPicos=(15*maximaSumaIntensidadesCorregidas)/100;

                fprintf('CARGADO ARCHIVO SUMA INTENSIDADES\n');

                % BASELINE CORRECTION
                espectroBaseline = msbackadj(posicionBanda,
sumaIntensidad, 'WINDOWSIZE', 8000, 'SHOWPLOT', 1);
                saveas(gcf, 'espectroBaselineReduction.jpg');

                % PEAK FINDING WITH WAVELETS DENOISING

```

```

picos=mspeaks(posicionBanda,espectroBaseline,'DENOISING',true,'HeightFilter',corteAlturaPicos,'SHOWPLOT',true);
    saveas(gcf,'picosEspectro.jpg');

    numeroPicos=length(picos)

    fid=fopen('picosEspectro.txt','a+');

    for m=1:numeroPicos;

        fprintf(fid,'%4.3f %4.3f\n',picos(m,1),picos(m,2));

    end;

    % INITIALIZATION
    for m=1:numeroPicos;

        picos(m,1)=0;
        picos(m,2)=0;

    end;

    for k=1:numeroDatosSumaIntensidad;

        posicionBanda(k,1)=0;
        sumaIntensidadsum(k,2)=0;

    end;

    fclose(fid);

end;
cd ..
end;

% ALEX LABORATORY COMPUTER

cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

end;
end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');

```

```

% MATLAB LANGUAGE PROGRAM.
% AIM:
%       - TO ESTABLISH A LINEAR RELATIONSHIP FOR THE PEAK INTENSITY LOGARITHM.
% =====

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

d=dir(pwd);
length(d);

for i=3:length(d);
    if(d(i).isdir);
        cd(d(i).name);

        nombreDirectorio=d(i).name;
        fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

        d1=dir(pwd);
        length(d1);

        for j=3:length(d1);
            if(d1(j).isdir);

                cd(d1(j).name);
                nombreDirectorio=d1(j).name;
                fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

                % SENTENCES TO GET THE LIST OF FILES OF THE CURRENT DIRECTORY.

                listaArchivos=dir;
                longitudlistaArchivos=length(listaArchivos);

                fprintf('CARGADO ARCHIVO CON LOS PICOS DEL ESPECTRO\n');
                load picosEspectro.txt

                posicionPicos=picosEspectro(:,1);
                intensidadPicos=picosEspectro(:,2);

                numeropicosEspectro=length(picosEspectro);
                logaritmoIntesidadPicos=log(intensidadPicos);

                maximo=max(logaritmoIntesidadPicos);
                minimo=min(logaritmoIntesidadPicos);

                % PERFORMING THE LINEAR SCALING
                pendiente=(maximo-minimo)/4;

                fid=fopen('escaladoLinealPicosEspectro.txt','a+');

                for m=1:numeropicosEspectro;

                    escalaLineal(m)=1+4*((logaritmoIntesidadPicos(m)-minimo)/(maximo-minimo))
                    fprintf(fid,'%4.0f %4.3f %4.3f
%4.3f\n',posicionPicos(m),intensidadPicos(m),logaritmoIntesidadPicos(m),escalaLineal(m));

                end;

                fclose(fid);

```

```
load escaladoLinealPicosEspectro.txt
x=escaladoLinealPicosEspectro(:,3);
y=escaladoLinealPicosEspectro(:,4);
plot(x,y);

saveas(gcf,'escaladoLineal.jpg');

% INITIALIZATION
pendiente=0;
maximo=0;
minimo=0;

for m=1:numeropicosEspectro;

    escalaLineal(m)=0;

end;

end;
cd ..
end;

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

end;
end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');
```

```

% MATLAB LANGUAGE PROGRAM.
% AIM:
%       - TO CALCULATE THE SHANNON INDEX
%=====

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

d=dir(pwd);
length(d);

for i=3:length(d);
    if(d(i).isdir);
        cd(d(i).name);

        nombreDirectorio=d(i).name;
        fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

        d1=dir(pwd);
        length(d1);

        for j=3:length(d1);

            if(d1(j).isdir);

                cd(d1(j).name);
                nombreDirectorio=d1(j).name;
                fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

                % SENTENCES TO GET THE LIST OF FILES OF THE CURRENT DIRECTORY.

                listaArchivos=dir;
                longitudlistaArchivos=length(listaArchivos);

                % INITIALIZATION OF VARIABLES
                N=0;
                suma=0;
                sumaAnterior=0;

                load escaladoLinealPicosEspectro.txt
                fprintf('CARGADO ARCHIVO BANDAS REPRESENTATIVAS');

                [numeroBandas, numeroColumnas]=size(escaladoLinealPicosEspectro)
                numeroEspecies=numeroBandas;

                for k=1:numeroBandas;
                    intensidadBanda(k)=escaladoLinealPicosEspectro(k,4);
                end;

                N=sum(intensidadBanda)

                for k=1:numeroBandas;
                    proporcionIndividuos(k)=intensidadBanda(k)/N;
                end;

                % SHANNON INDEX CALCULATION

                fid=fopen('indiceShannon_picosESpectro_Escalado.txt','a+');

                for m=1:numeroEspecies;

```

```

        elemento=proporcionIndividuos(m)*log2(proporcionIndividuos(m));
        suma=elemento+sumaAnterior;
        sumaAnterior=suma;
    end;

    indiceShannon=-1*sumaAnterior;
    fprintf(fid, '%10.3f\n', indiceShannon);
    fclose(fid);

    % INITIALIZATION OF VARIABLES

    for k=1:numeroBandas;
        intensidadBanda(k)=0;
        proporcionIndividuos(k)=0;
    end;

    elemento=0;
    suma=0;
    sumaAnterior=0;
    indiceShannon=0;

    end;
    cd ..
end;

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

end;

end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');

```

```

% MATLAB LANGUAGE PROGRAM.
% AIM:
%       - THE PROGRAM MAKES THE GRAPHICAL REPRESENTATION OF THE SHANNON INDEX
% =====

% ALEX LABORATORY COMPUTER
cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

d=dir(pwd);
length(d);

for i=3:length(d);
    if(d(i).isdir);
        cd(d(i).name);

        nombreDirectorio=d(i).name;
        fprintf('ESTOY EN EL DIRECTORIO: %s\n',nombreDirectorio);

        d1=dir(pwd);
        length(d1);

        load TODOSindiceShannon_picosESpectro_Escalado.txt

        fprintf('CARGADO ARCHIVO DEL INDICE DE SHANNON\n');

        numeroCarriles=[1:1:12];

        % GRAPH OF ALL SHANNON INDEX CORRESPONDING TO THE DIFFERENT LANES

        todosIndiceShannon=TODOSindiceShannon_picosESpectro_Escalado(:,1);

        hold all;

        plot(numeroCarriles,todosIndiceShannon,'--*','Linewidth',1,'MarkerSize',4);
        xlabel('LANE','fontsize',10,'fontweight','b');
        ylabel('SHANNON INDEX','fontsize',10,'fontweight','b');
        %grid on;

        %porcentaje=input('Introducir el porcentaje del máximo\n');

        %legend(porcentaje)

        % ALEX LABORATORY COMPUTER
        cd ('F:\TESIS\MATLAB PROGRAMACION ESPECTROS\SUMA INTENSIDADES PRUEBA\')

    end;

end;
fprintf('FIN EJECUCIÓN PROGRAMA\n');

```



## C. Autovectores de las variables geológicas

**Tabla 9.1:** Autovectores generados del análisis de componentes principales representado en la *Figura 6.3*.

Variables	Autovectores	
	e1	e2
Arena	-0,18	0,21
Arcilla	0,22	-0,16
Caliza activa	0,02	-0,25
Elemento grueso	0,18	0,06
Tierra fina	-0,18	-0,06
Arena gruesa	-0,20	0,04
Arena fina	-0,26	0,02
Limo grueso	0,25	0,05
Limo fino	0,25	-0,03
Limo	0,26	-0,01
Caliza total	0,26	-0,01
C	0,11	0,28
N	0,06	0,30
C:N	0,20	0,07
K (ppm)	0,07	0,28
Cu (ppm)	-0,14	0,25
Mn (ppm)	-0,10	0,27
Zn (ppm)	3,90E-03	0,31
B (ppm)	-0,06	0,27
pH	-0,26	-0,03
CE	0,23	0,10
CIC	0,25	0,07
Ca	0,25	0,07
Mg	0,23	-0,03
Na	0,16	0,22
K	0,07	0,28
K (mg)	-0,11	0,24
Ca (mg)	-0,11	0,10
Fe ICP (ppm)	-0,17	0,05
Fe extr (ppm)	-0,02	0,30

**Tabla 9.2:** Autovectores generados del análisis de componentes principales representado en la *Figura 6.4*.

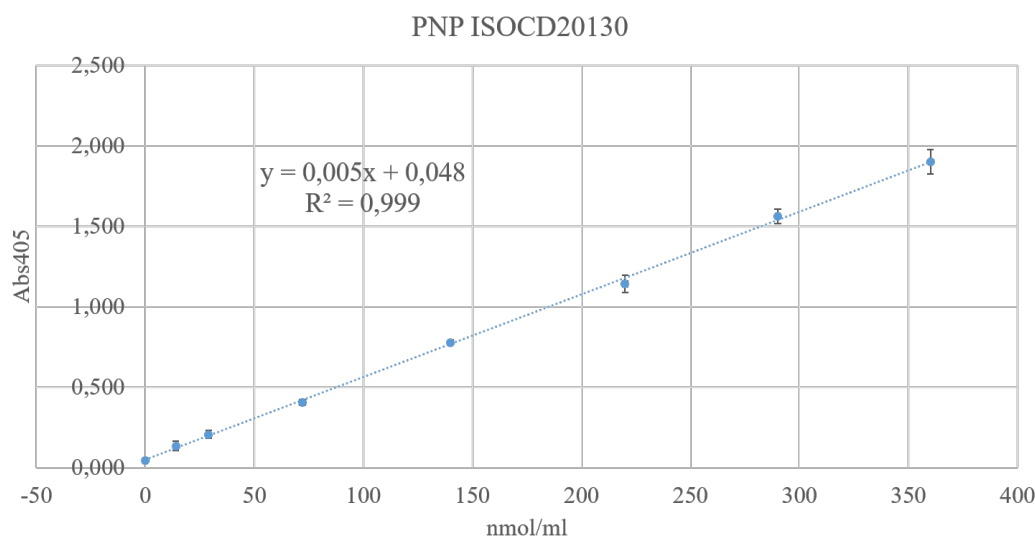
<b>Variables</b>	<b>Autovectores</b>	
	<b>e1</b>	<b>e2</b>
Caliza activa	-0,06	-0,43
Arena	0,31	0,34
Arcilla	-0,39	-0,26
Fe extr (ppm)	0,05	0,50
C	-0,19	0,47
Na	-0,29	0,37
CIC	-0,44	0,13
Tierra fina	0,34	-0,10
Arena gruesa	0,33	0,05
Arena fina	0,45	0,02

**Tabla 9.3:** Autovectores generados del análisis de componentes principales representado en la *Figura 6.5*.

<b>Variables</b>	<b>Autovectores</b>	
	<b>e1</b>	<b>e2</b>
Fe extractable (ppm)	0,33	0,25
Tierra fina	0,07	0,72
Arena gruesa	-0,21	-0,22
Arena fina	-0,42	0,05
C	0,37	-0,03
Na	0,21	-0,40
CIC	0,43	-4,6E-03
Caliza activa	0,20	-0,45
Arcilla	0,35	0,02
Arena	-0,38	-0,05

## D. Rectas de calibrado para la cuantificación de fosfatasa alcalina y $\beta$ -galactosidasa

La medida de la actividad enzimática del suelo se determina mediante la lectura del color generado por el sustrato cromogénico en un espectrofotómetro. Dependiendo del sustrato se mide a una determinada longitud de onda determinada. Para medir las actividades fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa se utiliza p-nitrofenil fosfato disódico hexahidratado (Merck; CAS 4264-83-9) y p-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (Merck; CAS 3150-24-1) como sustrato cromogénico respectivamente. La lectura del producto generado (p-nitrofenol) se efectúa a 405nm.



**Figura D.29:** Recta de calibrado para el cálculo de fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa mediante la lectura a 405nm del PNP liberado por acción enzimática.




## E. Artículos científicos publicados



Article

# Looking at the Origin: Some Insights into the General and Fermentative Microbiota of Vineyard Soils

Alejandro Alonso <sup>1</sup>, Miguel de Celis <sup>1</sup>, Javier Ruiz <sup>1</sup>, Javier Vicente <sup>1</sup>, Eva Navascués <sup>2</sup>, Alberto Acedo <sup>3</sup>, Rüdiger Ortiz-Álvarez <sup>3</sup>, Ignacio Belda <sup>3,4</sup>, Antonio Santos <sup>1,\*</sup>, María Ángeles Gómez-Flechoso <sup>5</sup> and Domingo Marquina <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Physiology and Microbiology, Unit of Microbiology, Biology Faculty, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Pago de Carraovejas, S.L.U., Camino de Carraovejas, s/n, 47300 Peñafiel, Valladolid, Spain

<sup>3</sup> Science Department, Biome Makers Spain, 47011 Valladolid, Spain

<sup>4</sup> Department of Biology, Geology, Physics & Inorganic Chemistry, Unit of Biodiversity and Conservation, Rey Juan Carlos University, 28933 Móstoles, Spain

<sup>5</sup> Department of Earth Physics & Astrophysics, Physics Faculty, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

\* Correspondence: ansantos@ucm.es; Tel.: +34-913-944-962

Received: 8 July 2019; Accepted: 27 August 2019; Published: 29 August 2019



**Abstract:** In winemaking processes, there is a current tendency to develop spontaneous fermentations taking advantage of the metabolic diversity of derived from the great microbial diversity present in grape musts. This enological practice enhances wine complexity, but undesirable consequences or deviations could appear on wine quality. Soil is a reservoir of important microorganisms for different beneficial processes, especially for plant nutrition, but it is also the origin of many of the phytopathogenic microorganisms that affect vines. In this study, a meta-taxonomic analysis of the microbial communities inhabiting vineyard soils was realized. A significant impact of the soil type and climate aspects (seasonal patterns) was observed in terms of alpha and beta bacterial diversity, but fungal populations appeared as more stable communities in vineyard soils, especially in terms of alpha diversity. Focusing on the presence and abundance of wine-related microorganisms present in the studied soils, some seasonal and soil-dependent patterns were observed. The *Lactobacillaceae* family, containing species responsible for the malolactic fermentation, was only present in non-calcareous soils samples and during the summer season. The study of wine-related fungi indicated that the *Debaryomycetaceae* family dominates the winter yeast population, whereas the *Saccharomycetaceae* family, containing the most important fermentative yeast species for winemaking, was detected as dominant in summer.

**Keywords:** meta-taxonomic analysis; vineyard soil; wine-related bacteria; wine-related fungi

## 1. Introduction

Microorganisms are very successful inhabitants of the soil due to their adaptability and plasticity to cope with adverse conditions [1]. There is a general assumption that, in many ecosystems, a high biodiversity enhances stability and productivity, and it is regulated by climate, soil properties and soil management aspects [1–3]. Since most biodiversity–productivity studies focus on plant diversity, this relationship requires a better understanding within the microbial populations inhabiting soils, as microorganisms play a crucial role in many key ecosystem functions involved in soil fertility [4–6]. Plants are dependent on the growth of soil microbes, which possess the metabolic machinery to access soil nutrients such as N, P, and S that, usually, are minimally bioavailable for them [7]. With hundreds

to thousands of taxa per gram of soil, it has been demonstrated that functional redundancy within the soil microbial community is high, indicating that microbial community diversity is dissociated from functioning [8,9]. Such evidence is considered to be highly relevant to infer the impact of climate changes and anthropic practices on soil microbial diversity and, in consequence, biogeochemical cycles in soils [6].

As indicated above, microbial communities are associated with plants, playing a role in soil productivity but also causing phytopathogenic diseases [10]. Numerous studies concerning soilborne microorganisms have been carried out, however, taking into consideration the agricultural, industrial, alimentary and economic implications of soil microorganisms, the development of new tools and approaches for determining their diversity and functions in soils is a continuous task [11].

The interface between roots and soil is probably the most important interaction between plants and their environment [12]. Soil microbes that colonize the plant at the root can move through the plant to colonize the rest of the tissues, promoting plant health or causing different diseases. To help the plant microbiome fight against pathogens, microorganism inoculation has been used in several crops, including vineyards, in an attempt to control plant pathogens using biological agents [11,13,14]. Moreover, the possibility that plant inhabiting microorganisms could influence the flavor and productivity of grapes, impacting the organoleptic characteristics of wine, has been reported [12]. On the other hand, one aspect of the relationship between plants and microorganisms that remains unclear is whether soil microorganisms could be related with postharvest processes, such as fermentative ones, including those related to the production of wine.

With the current tendency to recover past practices in winemaking, the wine industry is now frequently producing wines by spontaneous fermentation. This reformulated enology is emerging and aiming to combine the advantages of spontaneous fermentations with those of monitored fermentations. In such fermentations, the microbiota coming from the vineyard takes the leading role of the fermentation process, being the soil the main reservoir of wine-related microorganisms, inhabiting grape berries and thus the later grape must [15]. In this context, a clear connection has been demonstrated between winery and vineyard fermentative microbiota, with a transference of yeasts from the winery to the surrounding vineyards, influencing the native yeast communities [16–21]. As the number of spontaneous fermentation studies increases, the importance of the autochthonous microbiota of the vineyard studies increases too. Recent studies have indicated that grape and wine microbiome from different grape-growing regions correlate with wine metabolome, suggesting that the grape microbiome may influence regional wine characteristics [22].

To date, few studies have analyzed the relationship between the soil microbiota and its influence on the winemaking processes. Currently, microbiome analyzes start interconnecting multiple “omics” studies, leading to unprecedented opportunities to comprehensively characterize microbial communities and their relationships with their environments or subsequent processes [23]. To understand the crucial roles of microorganisms on the entire winemaking process, we should understand the relationship between vineyard and wine microbiomes, also paying attention to the soil microbiome [24]. The use of soil microbiota as an early predictor of wine *terroir* is unprecedented and poses a potential new challenge for quality control of wine [24].

This study analyzed the microbial, fungal and bacterial communities inhabiting the soils of different blocks of a unique vineyard, in which a relationship between vineyard and wine microbiota has been observed [20]. Thus, we aimed to determine the influence of soil properties in the inhabitant general and fermentative microbiota, and how it changes in a seasonal comparison: summer against winter.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Site Description and Weather Data

This research was carried out in a vineyard which belongs to Ribera del Duero Geographical Indication (VCPRD). The entire vineyard covers an area of approximately 1.80 km<sup>2</sup> and has a Mediterranean with Oceanic influence climate, corresponding to Csb on the Köppen–Geiger climate classification. The annual mean temperature in this region is 12.1 °C, and the multi-year average precipitation is about 434 mm (Spanish Meteorological Agency AEMET, 2166Y station). The main landform is of hills formed by calcareous deposition and windy sands, with an altitude ranging from 753 to 900 m. Soil types are comprised of sandy, clayey and calcareous ones. Sandy soils show a sand percentage of 59.8–75.3%. The clayey ones present a clay content ranging 22.5–24.5% and the calcareous soils have a limestone active fraction of 9.8–11.7%. Generally, the soils studied were fairly alkaline, with pH values around 8.58. In some samples, the detected pH values were higher due to the high percentage of limestone.

### 2.2. Soil Sampling

This study included 36 vineyard soil samples, collected in vineyard plots with sandy, clay and limestone soils. Five samples of sandy soils, two of clay soils and two of calcareous soils were taken. From each sample, a replica was made 30 m away. Soil samples were taken by previously removing the surface layer of leaves that might be on the ground. The 5–25 cm-depth samples were taken to collect the maximum cellular density [25]. This sampling process was done in two seasons: summer and winter.

### 2.3. DNA Extraction and Sequencing

Soil samples, collected as described, were analyzed following a 16S-ITS metabarcoding strategy for determining bacterial and fungal populations. Samples were stored at −80 °C until DNA extraction was performed using different bead-beating cycles based on DNA extraction kits such as DNeasy<sup>®</sup> Powerlyzer<sup>®</sup> Powersoil<sup>®</sup> Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Libraries were prepared following the two-steps PCR Illumina<sup>®</sup> protocol and these were subsequently sequenced on Illumina<sup>®</sup> MiSeq instrument (Illumina<sup>®</sup>, San Diego, CA, USA) using 2 × 301 paired-end reads.

All PCR reactions were prepared using sterilized materials and negative controls were run alongside the samples. In addition, PCR conditions such as number of cycles, annealing temperature, thermocycler and Master-mix composition were done according to the WineSeq<sup>®</sup> technology procedures. The library was performed using a two-step PCR protocol as described by Feld et al. [26] and Albers et al. [27] and then it was analyzed by amplifying and sequencing the V4 16S rRNA V4 gene region and the ITS1 (ITS) regions using WineSeq<sup>®</sup> custom primers (patent WO2017096385 [28]).

### 2.4. Bioinformatic Analysis

The raw fastq sequences (available at <https://data.mendeley.com/datasets/yf5mk58kwz/2>) were analyzed using DADA2 algorithm [29] implemented in R pipeline [30]. DADA2 implements an error correction model that allows the differentiation of a single nucleotide [31], giving an amplicon sequence variant (ASV) table as a final output. The reads were truncated at their low-quality ends, forward and reverse paired, and chimeras removed. The total good quality reads were 1,636,020 for bacteria and 2,260,792 for fungi. The taxonomic assignment was performed using the naïve Bayesian classifier implemented in DADA2 using as reference Silva (release 132) reference database [32].

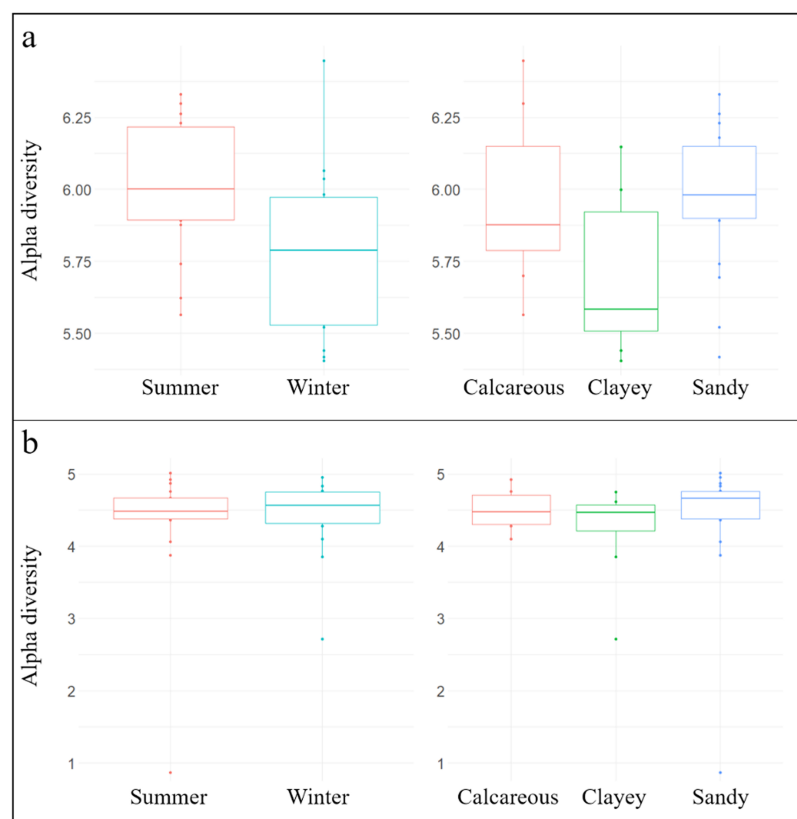
### 2.5. Functional Profiles Prediction

Functional predictions based on representative genomes are a useful tool for the estimation of metabolic potential [33]. Although it has limitations regarding strain-specific functional signatures,

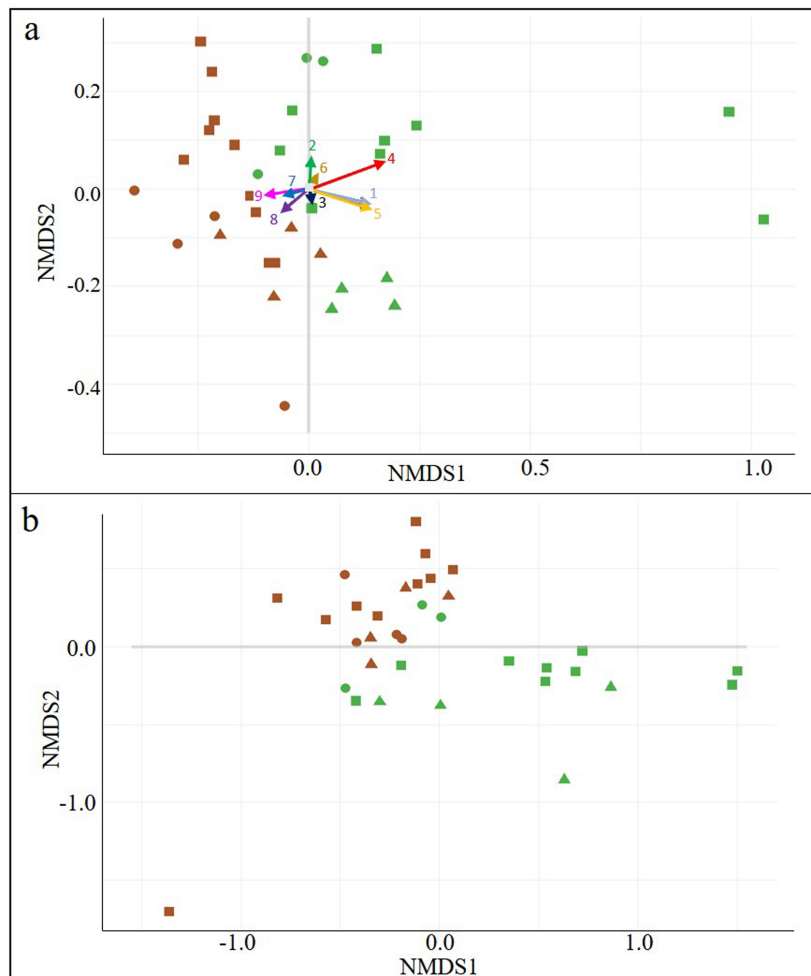
environmental distributions, or real magnitude of a process, the functional simulations allow the comparison of communities in terms of their predicted functional potential [34]. For that purpose, we applied an adaptation of the Tax4Fun routine [35] using presence/absence of genes rather than a normalized weighted value per taxa (<https://sourceforge.net/projects/Tax4Fun2/>). To obtain the proportion of each community containing each specific function, we filtered a total of 25 KEGGs (functional orthologs) within 14 metabolic pathways related to carbon, nitrogen, phosphorus and sulfur cycles pathways (Table A2). We estimated the distribution of each metabolism and their mean proportions in the microbial population of each soil sample.

## 2.6. Statistical Analysis

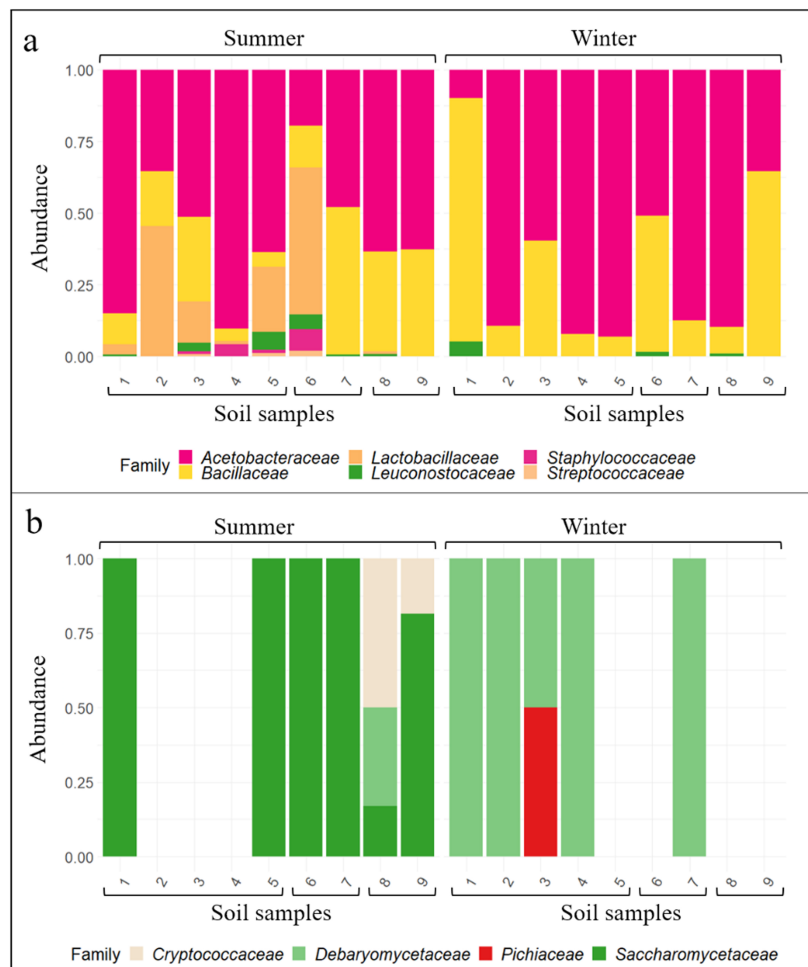
Statistical analysis was performed on R (version 3.5.1) using the phyloseq package, version 1.26.1 [36] and vegan, version 2.5.5 [37]. Alpha diversity was calculated as estimated community diversity using Shannon index [38] and ANOVA test was used to calculate significant differences among sample groups (Figure 1). Beta diversity (differences between samples) was calculated using Bray–Curtis distance matrix on proportion transformed data [39,40] and permutational multi-variate analysis of variance (PERMANOVA). Non-Metric Multi-Dimensional Scaling (NMDS) was computed from the resulting distance matrices to compress dimensionality into two-dimensional plots (Figure 2). For heat map plots, pheatmap package version 1.0.12 R was used (Figure 3).



**Figure 1.** Alpha diversity, measured as Shannon index, calculated on bacterial subset of the dataset (a) showed significant differences ( $p$ -value = 0.012) among seasons, but not among soil types ( $p$ -value = 0.056). When alpha diversity was calculated on the fungal subset of the dataset (b), no statistically significant differences were found for seasons ( $p$ -value = 0.716) and for soil type ( $p$ -value = 0.771).



**Figure 2.** Beta diversity calculated on bacterial (a) and fungal (b) datasets shown in a non-parametric multi-dimensional scale (NMDS) using Bray-Curtis distance. The stress parameter used in the bacterial analysis to define the ordination quality was 0.160. Significant differences were found among different season samples ( $p$ -value = 0.001) and for samples of different soil types ( $p$ -value = 0.058). Stress parameter used in the fungal analysis to define the ordination quality was 0.145. Significant differences were found among different season samples ( $p$ -value = 0.001) and for samples of different soil types ( $p$ -value = 0.052). Seasons (summer (brown) and winter (green)), oil types (calcareous (○), clayey (△) and sandy (□)). Figure 2a includes information on the contribution of some bacterial-derived soil-related metabolic functions, inferred from the taxonomical bacterial diversity using the Tax4Fun routine. The nine vectors showed were calculated from the relative abundance of metabolic enzymes (KEGG) corresponding to: (1) carbon organic formation; (2) carbon organic use; (3) nitrogen organic formation; (4) nitrogen organic use; (5) other; (6) phosphorus inorganic transport; (7) phosphorus organic transport; (8) sulfur organic formation; and (9) sulfur organic use. A detailed list of the metabolic enzymes (KEGG) included on each group is reported in Table A2.



**Figure 3.** Abundance of wine-related bacterial (a) and fungal (b) families in soil samples and classified according to the soil characteristics (Sandy (1–5), clayey (6–7) and calcareous (8–9)) and the season (summer and winter).

Physical-chemical data of the soil were analyzed by Infostat© statistical program [41], using the analysis of main components for the classification of different soils (clay, sandy and limestone) and the subsequent representation of the variables in the two-dimensional principal subspace (Figure A1).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. General Biodiversity

There is a general assumption which indicates that the larger the environmental heterogeneity is the larger the diversity of complex organisms is, indicating that more heterogeneous habitats usually present higher species alpha diversity [42,43]. However, despite the recognized central role of bacteria in the soils’ fertility, less knowledge has been reported concerning the link between the environmental heterogeneity and bacterial diversity [44,45]. Several investigations have reported that locations highly different in their environmental and physicochemical parameters usually tend to be very different in their bacterial community composition too [46,47], suggesting that soil heterogeneity increases bacterial beta diversity. Even though the relationship between soil environments and fungal diversity is less known [48], some meta-analysis studies have indicated that, in addition to bacterial alpha diversity, fungal alpha diversity is higher in fields with crop rotations [49] or in temperate deciduous forests [50].

In this study, we analyzed the general microbial diversity (bacterial and fungal population), with the aim of determining the potential connections between soil and wine-related microbiota from

different vineyards. The microbial diversity as alpha diversity of the vineyard soils was measured using the Shannon index (measure of the species richness and abundance), comparing the effect of two seasons (summer and winter), with very different conditions of temperature and humidity in the sampled region. The climate conditions in the center of Spain are characterized by cold and humid winters, while the summers are hot with very little and occasional rainfall. In addition, the impact of the textural characteristics of the soils (Figure A1) were determined, studying their impact over microbial biodiversity [51] (Figure 1).

The seasonal effect on bacterial alpha diversity changes significantly between seasons. The complexity of bacterial communities has been generally described to be lower in winter than summer [52,53], and our results are in agreement with this observation (Figure 1a). As a result, we hypothesize about the possibility whether the soil bacterial community can be used as a new biological parameter to be considered in vineyard soils zoning strategies in viticulture soils or not. In contrast to bacterial diversity, fungal diversity did not change with the seasons (Figure 1b) and showed a lower Shannon index and greater dispersion than the bacterial subset. The fungal community inhabiting soils was more homogeneous during seasons, maintaining the regional homogeneity of the studied soils. Bacterial populations showed a microscale effect due to their heterogeneity in summer and winter. Although fungi populations could become an indicator of regional character in vineyard blocks.

In this study, we analyzed bacterial diversity as a function of the textural characteristics: calcareous, clayey and sandy soils (Table A1). A lower bacteria diversity was observed in the different types of soil (Figure 1a). Although the differences in the Shannon index among clayey, calcareous and sandy soils using ANOVA test were slightly statistically significant ( $p$ -value = 0.056), it was observed that the Shannon index is different between sandy and clayey soils. No differences were observed in soil types in the fungal subset analyses (Figure 1b).

Beta diversity was calculated as dissimilarity between soil samples, according to the ASVs extracted from the raw data curation process. In the non-parametric multi-dimensional scale ordering (NMDS), the ASVs of the group of bacteria (Figure 2a) and the fungi subset (Figure 2b) show the distances of each soil sample.

The bacterial population separates into two groups defined in the NMDS1 component ( $p$ -value = 0.001). The bacterial subset present in soils in winter was observed for NMDS1 > 0, approximately. Furthermore, the samples whose bacterial population defined the summer season were located for NMDS1 < 0 (Figure 2a). The textural characteristics of the soil were also statistically significant ( $p$ -value = 0.001), having NMDS2 > -0.1 for sandy soils, approximately, and NMDS2 < -0.1 for the other two soils (calcareous and clayey).

Sorting based on stress index for the fungi group allowed separation in the NMDS2 component ( $p$ -value = 0.001). The population of fungi linked to winter were found in NMDS2 < 0. In samples collected in summer, the fungal population was observed in NMDS2 > 0. Statistical analyses of the textural characteristics were also slightly significant ( $p$ -value = 0.052) since this separation was not too clear to define as a function of the NMDS values.

Based on the genomic sequencing of the V4 16S rRNA gene region, it was possible to estimate the functional genes that the bacterial population could express in the soil. The estimated metabolic functions include enzymes involved, among others, in the biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, phosphorus and sulfur (vectors at Figure 2a). Based on that, the metabolic routes involved in organic carbon formation, organic nitrogen use and others (see Table A2 for a detailed list of the metabolic routes included) appeared more represented in winter samples. We can hypothesize that this could be because winter samples were collected in January, and a greater concentration of organic matter is accumulated in the soil (coming from fall autumn leaves). On the other hand, summer samples cluster matched the direction of the contribution of metabolic routes involved in sulfur metabolism (organic formation and use). This can be explained as summer samples were collected in early June

and some routine sulfur-based treatments were applied in April and May for guaranteeing a healthy grape ripening.

Nevertheless, contrary to what was observed at taxonomic (alpha and beta diversity) level, there is not a clear pattern clustering the soils samples coming from different soil types or collected at different seasons (Figure A2). This can indicate that the taxonomic differences found between vineyard blocks are buffered at a functional level due to the high functional redundancy commonly found within soil microbial communities [8,9].

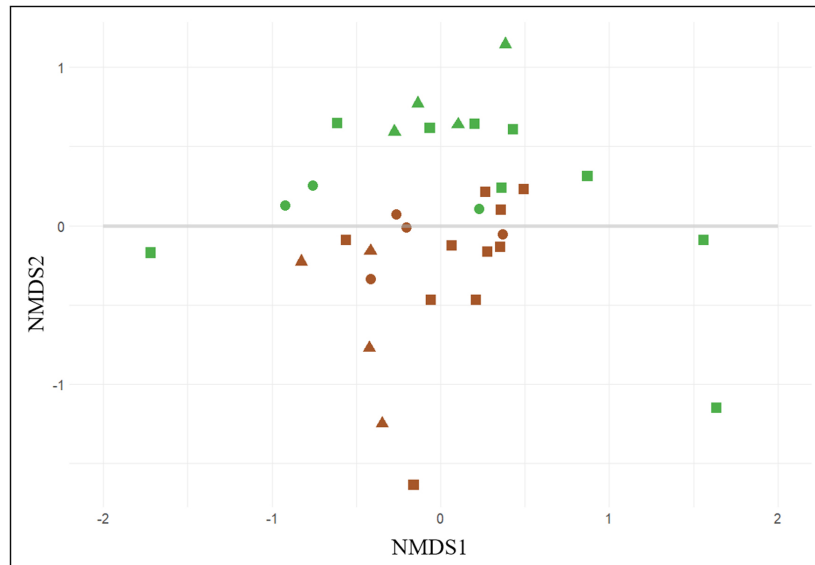
### 3.2. Wine-Related Microbial Diversity

Since the soil has been reported as the main reservoir of microorganisms in the vineyard, and a notable co-occurrence of microorganisms exists among vineyard soils, grapes and musts [15,24], it is of interest to study the presence, diversity and abundance of wine-related bacterial and fungal species in the studied soils. Soil microbiota has been described as important, not only for the chemical and nutritional properties of soils, but also for health, yield, and quality of the grapevine. Apart from being the origin of the fermentative microbiota that will reach the winery as part of the microbial consortia established in the grapes—which would be responsible for positive flavor compounds production or in the production of undesirable molecules (off-flavors, biogenic amines, etc.)—the soil microbiome has been directly co-related with some flavor characteristics of wines (via plant-microbiome interactions), such as the rotundone concentration found in Shiraz grapes from Australian Cool Climate areas [54]. Thus, in response to the current trend of elaborating “single-vineyard” wines as a way to enhance the *terroir* characteristics of each vineyard block, understanding the microbial signature of soils should be considered in future vineyard zoning works, when trying to define their fermentative potential. The raw data from the sequencing process were filtered, obtaining the abundances of the microorganisms previously described to be isolated from wine-related samples (Table A3).

The WRB found in the meta-taxonomic studies of soils were filtered at the taxonomic level of family due to the limitations showed by the NGS-technique used in this work [55]. The soil samples collected in winter and summer differ in the presence of the family *Lactobacillaceae*, being of greater presence in summer and absent in winter, while *Leuconostocaceae* appears in more plots in summer samples. Some examples of species from these families are *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* (*Leuconostocaceae*), *Lactobacillus* and *Pediococcus* (*Lactobacillaceae*), mainly responsible for malolactic fermentation [56]. In addition, various species of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* can cause spoilage of wine during bulk storage in the cellar and after bottling [57]. No differences were observed by soil type, although in summer calcareous Samples 8 and 9 showed a similar abundance pattern. However, it is possible that in Plots 7–9 the absence of the *Lactobacillaceae* family was due to an active limestone concentration of more than 5.1% (Table A1). The pronounced prevalence of the *Acetobacteraceae* family observed in winter stood out. The ability of acetic acid bacteria to convert ethanol in acetic acid is one of the main sources of wine spoilage. Both grapes and wine are subject to spoilage by this bacteria at different stages of the grape ripening and the winemaking processes [58].

The wine-related fungi (WRF) present in the soils were the *Cryptococcaceae*, *Debaryomycetaceae*, *Pichiaceae* and *Saccharomycetaceae* families (Figure 4b). However, within some samples, no representatives of these families were found. In summer soils samples from Plots 2–4 and winter samples from Plots 5, 6, 8 and 9, no WRF families were detected. In the summer season, a clear prevalence of the family *Saccharomycetaceae* was observed in Plots 1, 5, 6 and 9. Plot 8 did not present fungi of the family *Cryptococcaceae* and *Debaryomycetaceae*. It is important to highlight that the calcareous soils of Plots 8 and 9 showing the presence of the WRF family *Cryptococcaceae* were the only ones that presented this family during summer. In winter, a high frequency of the family *Debaryomycetaceae* was observed in Plots 1, 2, 4 and 7. The soil of Plot 3 showed the *Pichiaceae* and *Debaryomycetaceae* families, which were equally represented. Due to the succession of families *Saccharomycetaceae* and *Cryptococcaceae* between summer and winter, WRF seems to be a better indicator for differentiating the seasonal fermentative potential among plots.

The beta diversity analyzed in the WRB families shows a clear distinction between winter and summer (Figure 4). The component NMDS2 allowed good separation between the variations in the subset of bacteria. The winter samples were mainly arranged in  $NMDS2 < 0$ , while variations in summer samples were disposed in  $NMDS2 > 0$ .



**Figure 4.** Beta diversity calculated on bacterial datasets shown in a non-parametric multi-dimensional scale (NMDS) using Bray–Curtis distance. Wine related family bacteria exhibited significant seasonal ( $p$ -value = 0.001) variations in soil samples, but this variation was not evident between soil types ( $p$ -value = 0.058). Seasons (summer (brown) and winter (green)). Soil types (calcareous (○), clayey (△) and sandy (□)).

#### 4. Conclusions

The microbial alpha diversity of the vineyard soils determined in this study varied between seasons (Figure 1), being bacteria a better indicator than fungi in the vineyard zoning and allowing to differentiate the sandy soils from the clayey ones. Furthermore, beta diversity allowed us to separate populations between seasons (summer vs. winter) from bacteria and fungi (Figure 2). The microbial *terroir*, at a single vineyard scale, could be a tendency in each season, although the bacterial function remained constant (Figure 3). Wine-related bacteria (WRB) remained constant between seasons, except for the family *Lactobacillaceae*. This family, moreover, was not found in soils with a percentage of limestone higher than 5.1% (Figure 4a). Wine-related fungi (WRF) described a summer population dominated by the *Saccharomycetaceae* family and another winter population represented mainly by the *Debaryomycetaceae* family (Figure 4b).

#### Future Perspectives

Although the relationship between the soil microbiome and in fruit-associated microbial composition is difficult to establish [59], it is possible to indicate that the microorganisms present in the vineyard influence through many routes the vine development and the quality and fermentative potential of grapes [60]. Analyzing the microbial particularities of different blocks of a single vineyard, we here highlight the concept of microbial *terroir*. Thus, our results can be used as a starting point for future scientific studies and in-field works considering the microbial aspects of soils in vineyards zoning works trying to define homogeneous *terroir* units. Apart from the direct importance of the microorganisms in soil health and vine yield, in the present work, we tried to establish a parallelism between the microorganisms that can be detected in the vineyard soils (as the main microbial reservoir in agricultural environments) and the microorganisms reported in different studies that could be found

during wine fermentation. The great inter-blocks variability found here highlights the importance of including the biological aspects of *terroir* for a complete understanding of the enological potential of vineyards. This study represents an advance in the knowledge of how the microorganisms detected in the vineyard environment, mainly present in the microbial reservoir of the soil, that could affect vine and grape development, and, through this, positively or negatively influence the resulting wine. In addition, taking into account that many of these microorganisms are not only detected but could play a role during fermentation, in this study, we identified the abundance of these microorganisms in the soil microbial reservoir. Future studies in this area will go through the analysis of how the presence of a certain microorganism or a particular microbial consortium present in the soil can influence the quality of a wine in a certain way and, how, through the precise use of appropriate viticulture techniques, we can favor or counteract the presence of these microorganisms. Additionally, this type of studies can contribute to the discovery of undetected microorganisms with optimal fermentation properties and, therefore, could be used as new microorganisms in oenology. Furthermore, they could also help to detect microorganisms for the biological control of pests or phytopathogenic fungi that affect the wood of the vine.

**Author Contributions:** A.A. (Alejandro Alonso), I.B., E.N., A.S. and D.M. were involved in the sampling and experimental design; A.A. (Alejandro Alonso), M.d.C. and M.A.G.-F. performed the formal data analysis; A.A. (Alejandro Alonso), I.B. and A.S. wrote the article; M.A.G.-F., E.N., A.S. and D.M. supervised the project; and E.N., J.R., J.V., R.O.-Á and A.A. (Alberto Acedo) contributed to data acquisition. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

**Funding:** Funding for the research in this paper was provided by Pago de Carraovejas Estate Winery (GLOBALVITI, IDI-20160750) and Biome Makers Spain S.L. (IDI-20180120) under the framework of the MINECO CDTI projects (Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, Centre for Industrial Technological Development).

**Acknowledgments:** Ignacio Belda acknowledges for his postdoctoral “Torres Quevedo” grant (PTQ-16-08253) provided by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness.

**Conflicts of Interest:** Eva Navascués is an employee of Pago de Carraovejas Estate Winery. Alberto Acedo is an employee of Biome Makers, and Rüdiger Ortiz-Álvarez and Ignacio Belda developed part of this work employed by Biome Makers

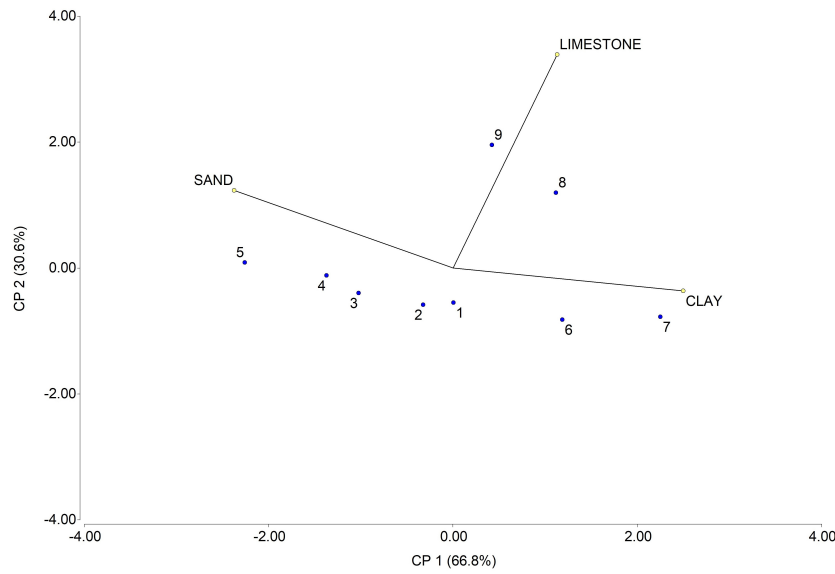
## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ASV	amplicon sequence variant
ITS	internal transcribed spacer
NMDS	non-parametric multi-dimensional scale
PCA	principal component analysis
VCPRD	a quality wine psr
WRB	wine-related bacteria
WRF	wine-related fungi

## Appendix A. Soil Compositional Characteristics

For this analysis, the database of physical-chemical parameters of the vineyard soils was used (<http://dx.doi.org/10.17632/yf5mk58kwz.2#file-0a4b4597-abb7-4df9-96f3-3ea7f44e5cd5>). The eigenvectors that implied a greater explanation in each component were analyzed and then the most relevant variables were taken. The statistical on PCA test (Figure A1) allowed classifying by means of different percentages of sand, clay and limestone in the soil (Table A1).



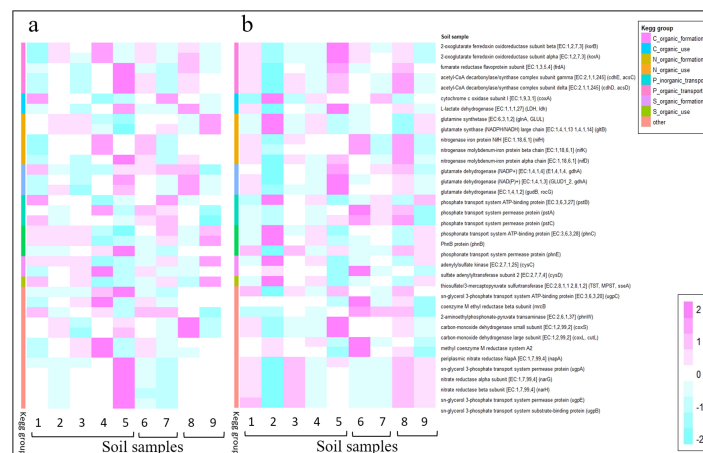
**Figure A1.** The two-dimensional principal subspace for the different textural soil percentages (correlation matrix PCA).

**Table A1.** Different compositional soils.

Soil Sample	Sand (%)	Clay (%)	Limestone (%)
1	59.8	20.4	3.1
2	62.5	19.8	2.6
3	63.7	16.4	2.8
4	65.9	15.0	3.4
5	75.3	13.7	2.9
6	48.3	22.5	3.7
7	39.5	24.5	5.1
8	58.0	22.4	9.8
9	62.5	19.3	11.7

**Appendix B. KEGGs and Metabolism Pathways**

From the raw data, a functional estimation of the bacterial population was carried out using Tax4Fun (<https://sourceforge.net/projects/Tax4Fun2/>). This process allowed us to estimate the functional status of the plots studied with respect to winter and summer.



**Figure A2.** Functional prediction of bacterial populations in different season. Summer (a) and winter (b).

**Table A2.** KEGG’s table.

KEGG	Functional Description: Name [EC] (gen)	Metabolism
K02274	cytochrome c oxidase subunit I [EC:1.9.3.1] (coxA)	Aerobic Respiration
K00174	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit alpha [EC:1.2.7.3] (korA)	Arnon Carbon Fixation
K00175	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit beta [EC:1.2.7.3] (korB)	Arnon Carbon Fixation
K00244	fumarate reductase flavoprotein subunit [EC:1.3.5.4] (frdA)	Arnon Carbon Fixation
K00860	adenylylsulfate kinase [EC:2.7.1.25] (cysC)	Assimilatory Sulfate Reduction
K00957	sulfate adenylyltransferase subunit 2 [EC:2.7.7.4] (cysD)	Assimilatory Sulfate Reduction
K00016	L-lactate dehydrogenase [EC:1.1.1.27] (LDH, ldh)	Fermentation
K05816	sn-glycerol 3-phosphate transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.20] (ugpC)	G3P Transporter
K00400	coenzyme Methyl reductase beta subunit (mrcB)	Methanogenesis
K00401	methyl coenzyme M reductase system A2	Methanogenesis
K00265	glutamate synthase (NADPH/NADH) large chain [EC:1.4.1.13, 1.4.1.14] (gltB)	Nitrogen Assimilation
K01915	glutamine synthetase [EC:6.3.1.2] (glnA, GLUL)	Nitrogen Assimilation
K02588	nitrogenase iron protein NifH [EC:1.18.6.1] (nifH)	Nitrogen Fixation
K02591	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain [EC:1.18.6.1] (nifK)	Nitrogen Fixation
K00261	glutamate dehydrogenase (NAD(P)+) [EC:1.4.1.3] (GLUD1 2, gdhA)	Nitrogen Mineralization
K00262	glutamate dehydrogenase (NADP+) [EC:1.4.1.4] (gdhA)	Nitrogen Mineralization
K00260	glutamate dehydrogenase [EC:1.4.1.2] (gudB, rocG)	Nitrogen Mineralization
K02567	periplasmic nitrate reductase NapA [EC:1.7.99.4] (napA)	Nitrogen Reduction
K02036	phosphate transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.27] (pstB)	Phosphate Transport High
K02038	phosphate transport system permease protein (pstA)	Phosphate Transport High
K02037	phosphate transport system permease protein (pstC)	Phosphate Transport High
K03430	2-aminoethylphosphonate-pyruvate transaminase [EC:2.6.1.37] (phnW)	Phosphonate Metabolism
K04750	PhnB protein (phnB)	Phosphonate Transport
K02041	phosphonate transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.28] (phnC)	Phosphonate Transport
K01011	thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase [EC:2.8.1.1, 2.8.1.2] (TST, MPST, sseA)	Sulfur Mineralization

**Appendix C. Wine-Related Microorganism**

The following families of microorganisms have been used to define WRBs and WRFs. The presented data were elaborated from the description of these microorganisms in the bibliography.

**Table A3.** Wine-related microorganisms taxonomy.

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Metschnikowiaceae
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Pichiaceae
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae
Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Cryptococcaceae

\* The information on the origin, occurrence and potential role of the wine related microorganisms (bacteria and yeasts) considered in this table can be found in the following references: Fleet (1993) [61]; König et al. (2009) [62]; Capozzi et al. (2011) [63]; and Benavent-Gil et al. (2016) [64].

**References**

1. Fraç, M.; Hannula, S.E.; Bełka, M.; Jędrzycka, M. Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Isbell, F.I.; Polley, H.W.; Wilsey, B.J. Biodiversity, productivity and the temporal stability of productivity: Patterns and processes. *Ecol. Lett.* **2009**, *12*, 443–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jactel, H.; Gritti, E.; Drössler, L.; Forrester, D.; Mason, W.; Morin, X.; Pretzsch, H.; Castagneyrol, B. Positive biodiversity–productivity relationships in forests: Climate matters. *Biol. Lett.* **2018**, *14*, 20170747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Balvanera, P.; Pfisterer, A.B.; Buchmann, N.; He, J.S.; Nakashizuka, T.; Raffaelli, D.; Schmid, B. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol. Lett.* **2006**, *9*, 1146–1156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Reed, H.E.; Martiny, J.B. Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, *62*, 161–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Maron, P.A.; Sarr, A.; Kaisermann, A.; Lévêque, J.; Mathieu, O.; Guigue, J.; Karimi, B.; Bernard, L.; Dequiedt, S.; Terrat, S.; et al. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02738-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Van Der Heijden, M.G.; Bardgett, R.D.; Van Straalen, N.M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* **2008**, *11*, 296–310. [[CrossRef](#)]
8. Allison, S.D.; Martiny, J.B. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11512–11519. [[CrossRef](#)]
9. Bardgett, R.D.; Van Der Putten, W.H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* **2014**, *515*, 505. [[CrossRef](#)]
10. Maron, J.L.; Marler, M.; Klironomos, J.N.; Cleveland, C.C. Soil fungal pathogens and the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol. Lett.* **2011**, *14*, 36–41. [[CrossRef](#)]
11. Katan, J. Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. *J. Plant Pathol.* **2017**, *99*, 305–315.
12. Gilbert, J.A.; van der Lelie, D.; Zorraonaindia, I. Microbial terroir for wine grapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Santos, A.; Marquina, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* **2004**, *150*, 2527–2534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Karuppiyah, V.; Li, T.; Vallikkannu, M.; Chen, J. Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zorraonaindia, I.; Owens, S.M.; Weisenhorn, P.; West, K.; Hampton-Marcell, J.; Lax, S.; Bokulich, N.A.; Mills, D.A.; Martin, G.; Taghavi, S.; et al. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* **2015**, *6*, e02527–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cordero-Bueso, G.; Arroyo, T.; Serrano, A.; Valero, E. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tello, J.; Cordero-Bueso, G.; Aporta, I.; Cabellos, J.; Arroyo, T. Genetic diversity in commercial wineries: Effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 302–315. [[CrossRef](#)]
18. Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* **2015**, *181*, 75–83. [[CrossRef](#)]
19. Garofalo, C.; El Khoury, M.; Lucas, P.; Bely, M.; Russo, P.; Spano, G.; Capozzi, V. Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 1395–1408. [[CrossRef](#)]
20. De Celis, M.; Ruiz, J.; Martín-Santamaría, M.; Alonso, A.; Marquina, D.; Navascués, E.; Gómez-Flechoso, M.Á.; Belda, I.; Santos, A. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Lett. Appl. Microbiol.* **2019**, *68*, 580–588. [[CrossRef](#)]
21. Viel, A.; Legras, J.L.; Nadai, C.; Carlot, M.; Lombardi, A.; Crespan, M.; Migliaro, D.; Giacomini, A.; Corich, V. The geographic distribution of *Saccharomyces cerevisiae* isolates within three Italian neighboring winemaking regions reveals strong differences in yeast abundance, genetic diversity and industrial strain dissemination. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bokulich, N.A.; Collins, T.S.; Masarweh, C.; Allen, G.; Heymann, H.; Ebeler, S.E.; Mills, D.A. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio* **2016**, *7*, e00631-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sirén, K.; Mak, S.S.T.; Fischer, U.; Hansen, L.H.; Gilbert, M.T.P. Multi-omics and potential applications in wine production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 172–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Belda, I.; Zarraonaindia, I.; Perisin, M.; Palacios, A.; Acedo, A. From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Raynaud, X.; Nunan, N. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Feld, L.; Nielsen, T.K.; Hansen, L.H.; Aamand, J.; Albers, C.N. Establishment of bacterial herbicide degraders in a rapid sand filter for bioremediation of phenoxypropionate-polluted groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 878–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Albers, C.N.; Ellegaard-Jensen, L.; Hansen, L.H.; Sørensen, S.R. Bioaugmentation of rapid sand filters by microbiome priming with a nitrifying consortium will optimize production of drinking water from groundwater. *Water Res.* **2018**, *129*, 1–10. [[CrossRef](#)]
28. Becares, A.A.; Fernandez, A.F. Microbiome Based Identification, Monitoring and Enhancement Of Fermentation Processes and Products. US Patent Application 15/779,531, 20 December 2018.
29. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
30. Callahan, B.J.; Sankaran, K.; Fukuyama, J.A.; McMurdie, P.J.; Holmes, S.P. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research* **2016**, *5*, 1492. [[CrossRef](#)]
31. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Holmes, S.P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* **2017**, *11*, 2639. [[CrossRef](#)]
32. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Langille, M.G.; Zaneveld, J.; Caporaso, J.G.; McDonald, D.; Knights, D.; Reyes, J.A.; Clemente, J.C.; Burkepille, D.E.; Thurber, R.L.V.; Knight, R.; et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 814–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ortiz-Álvarez, R.; Fierer, N.; de los Ríos, A.; Casamayor, E.O.; Barberán, A. Consistent changes in the taxonomic structure and functional attributes of bacterial communities during primary succession. *ISME J.* **2018**, *12*, 1658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aßhauer, K.P.; Wemheuer, B.; Daniel, R.; Meinicke, P. Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2882–2884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Oksanen, J.; Blanchet, F.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P.; O’Hara, R.; Simpson, G.; Solymos, P.; Stevens, M.; Wagner, H. Package “vegan.” *Community Ecol. Package* **2013**, *12*, 1–295.
38. Shannon-Wiener, C.; Weaver, W.; Weaver, W. *The Mathematical Theory of Communication*; EUA, University of Illinois Press: Champaign, IL, USA, 1949.
39. Bray, J.R.; Curtis, J.T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **1957**, *27*, 325–349. [[CrossRef](#)]
40. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Waste not, want not: Why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1003531. [[CrossRef](#)]
41. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarina, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. *Infostat Versión 2018*. Centro de Transferencia Infostat, FCA; Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2018.
42. Stein, A.; Gerstner, K.; Kreft, H. Environmental heterogeneity as a universal driver of species richness across taxa, biomes and spatial scales. *Ecol. Lett.* **2014**, *17*, 866–880. [[CrossRef](#)]
43. Heino, J.; Melo, A.S.; Bini, L.M. Reconceptualising the beta diversity–environmental heterogeneity relationship in running water systems. *Freshw. Biol.* **2015**, *60*, 223–235. [[CrossRef](#)]
44. Dickens, S.; Allen, E.; Santiago, L.; Crowley, D. Exotic annuals reduce soil heterogeneity in coastal sage scrub soil chemical and biological characteristics. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *58*, 70–81. [[CrossRef](#)]
45. Weber, C.F.; King, G.M.; Aho, K. Relative abundance of and composition within fungal orders differ between cheatgrass (*Bromus tectorum*) and sagebrush (*Artemisia tridentata*)-associated soils. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Horner-Devine, M.C.; Lage, M.; Hughes, J.B.; Bohannan, B.J. A taxa–area relationship for bacteria. *Nature* **2004**, *432*, 750–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Ranjard, L.; Dequiedt, S.; Prévost-Bouré, N.C.; Thioulouse, J.; Saby, N.; Lelievre, M.; Maron, P.; Morin, F.; Bispo, A.; Jolivet, C.; et al. Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Peay, K.G.; Baraloto, C.; Fine, P.V. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *ISME J.* **2013**, *7*, 1852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Venter, Z.S.; Jacobs, K.; Hawkins, H.J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. *Pedobiologia* **2016**, *59*, 215–223. [[CrossRef](#)]
50. He, J.; Tedersoo, L.; Hu, A.; Han, C.; He, D.; Wei, H.; Jiao, M.; Anslan, S.; Nie, Y.; Jia, Y.; et al. Greater diversity of soil fungal communities and distinguishable seasonal variation in temperate deciduous forests compared with subtropical evergreen forests of eastern China. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, *93*. [[CrossRef](#)]
51. Zhou, J.; Xia, B.; Huang, H.; Palumbo, A.V.; Tiedje, J.M. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1723–1734. [[CrossRef](#)]
52. Koranda, M.; Kaiser, C.; Fuchslueger, L.; Kitzler, B.; Sessitsch, A.; Zechmeister-Boltenstern, S.; Richter, A. Seasonal variation in functional properties of microbial communities in beech forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *60*, 95–104. [[CrossRef](#)]
53. Kaiser, C.; Fuchslueger, L.; Koranda, M.; Gorfer, M.; Stange, C.F.; Kitzler, B.; Rasche, F.; Strauss, J.; Sessitsch, A.; Zechmeister-Boltenstern, S.; et al. Plants control the seasonal dynamics of microbial N cycling in a beech forest soil by belowground C allocation. *Ecology* **2011**, *92*, 1036–1051. [[CrossRef](#)]
54. Gupta, V.V.S.R.; Bramley, R.G.V.; Greenfield, P.; Yu, J.; Herderich, M.J. Vineyard Soil Microbiome Composition Related to Rotundone Concentration in Australian Cool Climate ‘Peppery’ Shiraz Grapes. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kircher, M.; Kelso, J. High-throughput DNA sequencing—concepts and limitations. *Bioessays* **2010**, *32*, 524–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cappello, M.S.; Zapparoli, G.; Logrieco, A.; Bartowsky, E.J. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *243*, 16–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sponholz, W.R. Wine spoilage by microorganisms. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Taylor & Francis: Abingdon, UK, 1993; pp. 395–420.
58. Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *125*, 60–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Chou, M.; Vanden, H.J.; Bell, T.; Panke-Buisse, K.; J, K.K. Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, e00631-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Jackson, D.I.; Lombard, P.B. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality—A Review. *Am. J. Enol. Viticult.* **1993**, *44*, 409–430.
61. Fleet, G.H. *Wine Microbiology and Biotechnology*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1993.
62. König, H.; Uden, G.; Fröhlich, J. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*; Springer: Berlin, Germany, 2009.
63. Capozzi, V.; Ladero, V.; Beneduce, L.; Fernández, M.; Alvarez, M.A.; Benoit, B.; Laurent, B.; Grieco, F.; Spano, G. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 434–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Benavent-Gil, Y.; Berbegal, C.; Lucio, O.; Pardo, I.; Ferrer, S. A new fear in wine: Isolation of *Staphylococcus epidermidis* histamine producer. *Food Control* **2016**, *62*, 142–149. [[CrossRef](#)]









*Imagen cortesía de la BODEGA PAGO DE CARRAOVEJAS*