

Infraestructuras Ecológicas entre invernaderos: revegetación y calidad de suelos

E. Benítez^{1,*}, B. Moreno¹, D. Paredes¹, M. González³, M. Campos¹, E. Rodríguez²

(1) Estación Experimental del Zaidin (EEZ), CSIC, c/ Profesor Albareda 1. 18008 Granada, España.

(2) Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Centro IFAPA La Mojonera, Almería, España.

(3) Estación Experimental Las Palmerillas. Cajamar, Almería, España.

* Autor de correspondencia: E. Benítez [emilio.benitez@eez.csic.es]

> Recibido el 02 de julio de 2019 - Aceptado el 17 de septiembre de 2019

Benítez, E., Moreno, B., Paredes, D., González, M., Campos, M., Rodríguez, E. 2019. Infraestructuras Ecológicas entre invernaderos: revegetación y calidad de suelos. *Ecosistemas* 28(3):000-000. Doi.: 10.7818/ECOS.1800

Los cultivos bajo invernadero son extremadamente vulnerables a plagas. El papel clave que representa la biodiversidad funcional en el control de plagas mediante el uso de enemigos naturales ha sido evidenciado. Relacionado con este planteamiento surge el concepto de Infraestructura Ecológica, parches de hábitats seminaturales entre invernaderos que proporcionan hábitats de refugio para enemigos naturales de plagas. Sin embargo, su implantación en suelos degradados alrededor de los invernaderos de Almería no es tarea sencilla, ya que la mayoría de ellos son una mezcla de capas procedentes de los movimientos de tierra necesarios para la construcción de dichos invernaderos. En este trabajo se evaluó el efecto de la revegetación sobre la funcionalidad y diversidad de bacterias, implicadas en el mantenimiento de la red alimentaria del suelo. La revegetación aumentó la funcionalidad potencial microbiana, así como la biomasa de bacterias totales y activas. El análisis de la comunidad bacteriana mediante secuenciación de genes 16S rRNA mostró diferentes perfiles bacterianos ensamblados con la especie vegetal, la cual determinó las relaciones estequiométricas de nutrientes del suelo y por tanto las categorías de bacterias copiotróficas y oligotróficas. La predicción de funciones dependientes de la actividad bacteriana evidenció una redundancia funcional de grupos, lo cual sugiere, en todos los suelos estudiados, el aporte potencial de los servicios ecosistémicos relacionados. Dado que las relaciones funcionales entre el suelo y la parte aérea son fundamentales para asegurar la viabilidad de las Infraestructuras Ecológicas, la selección de plantas que mejoran el suelo debería ser un claro punto de partida.

Palabras clave: comunidad bacteriana; funcionalidad; plantas mejoradoras; resiliencia

Benítez, E., Moreno, B., Paredes, D., González, M., Campos, M., Rodríguez, E. 2019. Ecological Infrastructures among greenhouses: revegetation and soil quality. *Ecosistemas* 28(3):000-000. Doi.: 10.7818/ECOS.1800

Crops under indoor agriculture are extremely vulnerable to pests. It has been evidenced the role of functional biodiversity in pest control by using natural pest enemies. Directly linked to these assumptions have emerged the concept of Ecological Infrastructures, patches of semi-natural habitats distributed throughout greenhouses providing shelter habitats for pest natural enemies. However, implantation of Ecological Infrastructures in degraded soils -such as those around Almería greenhouses- is not a simple task since most of them are a mix of layers derived from the needed land movements for building greenhouses. In this work, we evaluated the effect of plant revegetation on functionality and diversity of bacteria, as drivers of food web structure. Revegetation increased microbial potential functionality and total bacterial biomass and diversity in a degraded soil. Analysis of the soil bacterial community using 16S rRNA gene sequencing showed distinct microbiota profiles depending on the plant species, which drove soil nutrient stoichiometry and then bacterial copiotrophic and oligotrophic categories. Predictions of bacteria-dependent functions evidenced the functional redundancy of groups, suggesting the potential provision of related ecosystem services in all the studied soils. Since feedbacks between the above-ground and belowground ecosystem processes are critical in Ecological Infrastructures functionality, selection of plants-ameliorating soil should be considered.

Key words: ameliorating plants; bacterial community; functionality; soil resilience

Introducción

El papel crítico que ejerce el suelo en el éxito de un programa de revegetación de tierras degradadas es bien conocido, en particular las interacciones entre los propios componentes del sistema suelo y los de la parte aérea (Wardle 2002). En este sentido, estudios recientes han demostrado cómo la alteración de las redes tróficas del suelo puede influir en gran medida en las interacciones tróficas de las redes alimenticias aéreas y viceversa (Ramírez et al. 2018), lo que lleva a cambios recíprocos en la composición de

las comunidades del suelo y las comunidades vegetales, incluida las propias plagas y los enemigos naturales de estas (Benítez et al. 2017). En general, se acepta que la microbiota del suelo juega un papel clave en el funcionamiento de ecosistemas edáficos. Esta funcionalidad se ve reflejada en el suministro de importantes servicios del ecosistema entre los que se encuentran el mantenimiento de la fertilidad y de una estructura apropiada en los suelos para el desarrollo vegetal, el secuestro de C y la regulación de gases de efecto invernadero, el control de plagas o la degradación de contaminantes orgánicos (Sacca et al. 2017; Benítez et al. 2017), etc.

De esta forma, se ha evidenciado la relación existente entre el efecto del manejo del suelo sobre el estado bioquímico y la diversidad genética microbiana del mismo (Moreno et al. 2009, Cañizares et al. 2012), así como la relación entre biodiversidad del nivel trófico correspondiente a descomponedores microbianos y el funcionamiento del ecosistema (Theault y Loreau 2006). Por otra parte, las relaciones entre el primer y el segundo nivel trófico han sido objeto de numerosas investigaciones durante los últimos años, las cuales establecen, de forma general, ciertos vínculos entre el genotipo de la planta y el microbioma presente en su rizosfera. Existen ciertas evidencias sobre la capacidad de los exudados de la raíz para influir en la estructura de las comunidades microbianas asociadas (Pascault et al. 2013; Sasse et al. 2018). No obstante, el conocimiento de la conexión entre el desarrollo de la planta, la exudación de la raíz y el ensamblaje de microbioma es todavía limitado (Lei et al. 2018).

El presente trabajo se enmarca dentro de un programa de Control Biológico por Conservación en la zona de invernaderos de Dalias (Almería, España). Actualmente, existe una normativa a nivel local que obliga al establecimiento de infraestructuras verdes en el entorno de los invernaderos de nueva creación (B.O.P de Almería número 148 del 3 de agosto de 2017); y a nivel autonómico, existe otra normativa que subvencionan ayudas para su establecimiento (BOJA número 69 de 11 de abril de 2017). Se ha demostrado que el manejo adecuado del hábitat puede mejorar la supervivencia de los enemigos naturales y, por lo tanto, mejorar su eficiencia como agentes de control de plagas, proporcionándoles recursos vegetales como polen, néctar, sitios de apareamiento o refugio (Landis et al. 2000; Fielder et al. 2008). Sin embargo, la pérdida y el aislamiento de hábitats seminaturales en el área de producción de invernaderos de Almería, caracterizada por un paisaje homogéneo y muy fragmentado con biodiversidad reducida, lo hacen extremadamente vulnerable a plagas (van der Blom y Crisol 2018). Una opción para superar esta eventualidad podría ser promover el control biológico por conservación, mejorando la supervivencia, el rendimiento y la efectividad de los enemigos naturales autóctonos de las plagas, mediante la gestión del hábitat tanto a escala local como a escala de paisaje (Barbosa 1998). La principal herramienta para alcanzar dichos objetivos son las Infraestructuras Ecológicas. Las Infraestructuras Ecológicas son elementos del paisaje distintos al cultivo y gestionados de forma extensiva, como setos, bordes de bosque, así como franjas de flores silvestres, y promontorios de conservación (Boller et al. 2004). Sin embargo, la implantación de Infraestructuras Ecológicas en tierras degradadas, como las que rodean los invernaderos de Almería, puede verse comprometida ya que la mayoría de ellos son en realidad una combinación de capas derivadas de los movimientos de tierra necesarios para construir invernaderos. En este sentido, el concepto de calidad del suelo, al estar inherentemente integrado en la ecología del suelo, ha sido considerado como una herramienta viable para evaluar la restauración de ecosistemas (Heneghan et al. 2008). El primer paso para estimar la calidad del suelo es la identificación de funciones críticas tales como degradación de materia orgánica, ciclos de nutrientes o biodiversidad microbiana (Karlen et al. 2003; García et al. 2012), ya que se ven afectadas no solo por las propiedades del suelo, sino también por el clima, el paisaje, el manejo, y las relaciones entre estas variables.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad y el efecto que sobre la calidad y funcionalidad del suelo ejercen cinco plantas autóctonas diferentes, seleccionadas por ser especies ricas en polen y/o néctar, periodos de floración superpuestos o arquitectura o morfología. En este sentido, las labiadas son especies ampliamente conocidas por tener altas cantidades de néctar y poseer un valor como plantas melíferas. Dos especies de labiadas han sido utilizadas: el romero (*Rosmarinus officinalis*), que es una planta de porte arbustivo y que posee una floración prologada en el tiempo, y el tomillo de invierno (*Thymus hyemalis*), que es una planta de porte rastro y que, como su propio nombre indica, florece durante el invierno. La bolina (*Genista umbellata*) es una leguminosa que presenta una floración muy profusa. Posee un porte muy ramificado

desde su base con ramas rígidas que portan flores ricas en polen. Finalmente, especies como el cornical (*Periploca angustifolia*) y la efedra (*Ephedra fragilis*) fueron utilizadas porque no albergan niveles altos de abundancia de las plagas más importantes que afectan usualmente a la horticultura intensiva (Rodríguez et al. 2017). Dichos atributos funcionales pueden favorecer un posible control biológico de plagas hortícolas ya que permiten el mantenimiento en el paisaje agrícola a través del tiempo, de poblaciones de niveles tróficos altos. Para la selección de especies, también se consideraron otros criterios importantes desde el punto de vista fitosanitario, como que dichas plantas no actúen como huéspedes de virus hortícolas. Asumiendo que la identidad de la especie de la planta determina fuertemente la composición y estructura de las redes tróficas del suelo, este trabajo corroboró la hipótesis que las bacterias del suelo asociadas a las diferentes especies vegetales forman grupos relativamente diversos, pero funcionalmente semejantes.

Material y métodos

Diseño experimental

El trabajo se realizó en un bosque-isla establecido en diciembre de 2010 en La Estación Experimental Cajamar, en la provincia de Almería (36°48' N, 2°3' W), con una elevación de ~ 155 m. La infraestructura ecológica tiene una superficie de 800 m² y está compuesto por 900 plantas de 29 especies diferentes, pertenecientes a 18 familias botánicas. Las plantas fueron cedidas por la red de Viveros Forestales de la Junta de Andalucía y tenían 3 años de edad en el momento de su plantación. Estas plantas fueron seleccionadas mediante un análisis multicriterio en el que se evaluaron más de 70 arbustos autóctonos (Rodríguez et al. 2012). Los criterios más importantes para la selección de las plantas fueron aquellos relacionados con los recursos específicos que las plantas pueden ofrecer a los diferentes grupos de insectos beneficiosos (alimento, refugio o lugares de apareamiento). También se consideraron la diferente arquitectura de las plantas, su porte, disponibilidad en viveros forestales y su grado de protección, la facilidad de su manejo, así como si estas plantas están citadas como posibles reservorios de virus (Rodríguez et al. 2014). La disposición de las plantas en el bosque-isla se realizó teniendo en cuenta como estas especies se asocian en la naturaleza con el objetivo de representar una mancha de vegetación natural (Tabla 1).

De la Infraestructura Ecológica se seleccionaron 5 plantas pertenecientes a 4 familias diferentes; *Genista umbellata* (L'Her.) Dum. Cours. (Fabales, Fabaceae), *Thymus hyemalis* Lange (Lamiales, Lamiaceae), *Periploca angustifolia* Labill. (Gentianales, Apocynaceae), *Ephedra fragilis* Desf. (Gnetales, Ephedraceae), *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiales, Lamiaceae). Se tomaron aproximadamente 200 g de suelo de la zona rizosférica, lo más cercano posible a las raíces sin dañarlas, de tres plantas diferentes, separadas aproximadamente 8 metros entre ellas, de cada una de las especies vegetales ensayas, y se conservaron en hielo hasta su llegada al laboratorio. Una vez en laboratorio cada muestra de suelo se dividió en tres alícuotas, una conservada a 4°C para el análisis enzimático, otra a -80°C para el análisis de ácidos nucleicos y otra secada al aire para el resto de análisis químicos. El tratamiento Control consistió en el mismo suelo desprovisto de vegetación.

Cuantificación y análisis de diversidad bacteriana

El ADN total de cada réplica de suelo se obtuvo a partir de la extracción, unión y concentración de cuatro submuestras de 1 g cada una, con el kit de aislamiento de ADN del suelo *UltraClean PowerSoil* de MoBio (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, EE. UU.). Para la secuenciación *Illumina*, los extractos se agruparon en una sola muestra y se concentraron a 35°C hasta un volumen final de 20 µl, con la ayuda de un concentrador Savant Speedvac®. Igualmente, el ARN total correspondiente a las muestras anteriores, se obtuvo a partir de la extracción, unión y concentración de cuatro submuestras de 2 g cada una, con el kit de aislamiento de ARN total *RNAse PowerSoil* de MoBio (MoBio laboratories, Solana

Tabla 1. Plantas arbustivas autóctonas utilizadas para mejorar el paisaje y el control biológico natural de plagas en la horticultura intensiva de invernadero en Almería (sureste de España).

Table 1. Autochthonous shrub plant species used to improve landscape and natural biological pest control in intensive horticulture in greenhouses in Almería (Southern Spain).

Recurso alimenticio ofrecido	Nombre científico	Nombre común	Familia	Número
polen	<i>Ephedra fragilis</i> Desf.	efedra	Ephedraceae	7
	<i>Genista umbellata</i> Poir.	bolina	Fabaceae	7
	<i>Macrochloa tenacissima</i> (L.) Kunth	esparto	Poaceae	9
	<i>Myrtus communis</i> L.	mirto	Myrtaceae	7
	<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> L.	acebuche	Oleaceae	3
	<i>Phillyrea angustifolia</i> L.	labiérnago	Oleaceae	10
néctar	<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	bocha blanca	Fabaceae	6
	<i>Lavandula latifolia</i> Medik.	espliego	Lamiaceae	6
	<i>Lycium intricatum</i> Boiss.	cambrón	Solanaceae	4
	<i>Phlomis purpurea</i> L.	matagallos	Lamiaceae	2
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	romero	Lamiaceae	25
	<i>Thymus hyemalis</i> Lange.	tomillo invierno	Lamiaceae	17
	<i>Thymus vulgaris</i> L.	tomillo común	Lamiaceae	19
	<i>Viburnum tinus</i> L.	durillo	Adoxaceae	4
polen /néctar	<i>Anthyllis cytisoides</i> L.	albaida	Fabaceae	2
	<i>Crithmum maritimum</i> L.	perejil marino	Apiaceae	6
	<i>Dittrichia viscosa</i> (L.) Greuter	olivarda	Asteraceae	2
	<i>Periploca angustifolia</i> Labill.	cornical	Asclepiadaceae	6
	<i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boiss.	retama	Fabaceae	3
	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>lycioides</i> L.	espinos negro	Rhamnaceae	10
	<i>Whitania frutescens</i> (L.) Pauquy.	oroval	Solanaceae	6

Beach, CA, EE. UU.). Para la secuenciación *Illumina*, los extractos se agruparon en una sola muestra y se concentraron adicionalmente a 35°C hasta un volumen final de 80 µl usando un concentrador Savant Speedvac®. El cDNA se sintetizó a partir de 1-2 µg de RNA-DNasa total utilizando el kit de síntesis de cDNA *Transcriptor High Fidelity Kit* (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

Para el estudio de la composición bacteriana (análisis metagenómico) y de las bacterias metabólicamente activas (análisis transcriptómico) presente en las diferentes muestras, se llevó a cabo la secuenciación de la región V4 del gen 16S ARNr (cebadores 515F y 806R) mediante la plataforma *Illumina MiSeq* (aScidea, Sant Cugat del Vallès, Barcelona) previa mezcla y normalización de todas las extracciones de cada una de las tres réplicas. Las secuencias obtenidas se analizaron taxonómicamente mediante la base de datos (<http://rncentral.org/>). Todas las secuencias obtenidas a partir de la plataforma *Illumina* fueron depositadas en el Servicio de Archivo de Lectura de Secuencias (SRA) de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) (*BioProject ID*: PRJNA312772, números de acceso de datos de metagenómica: SRX1809212, SRX1809208, SRX1809201, SRX1809194, SRX1809131, SRX1809109, números de acceso de datos de transcriptómica: SRX1809215, SRX1809210, SRX1809204, SRX1809196, SRX1809154, SRX1809124).

Análisis químicos

C y N total se determinaron con analizador elemental *Leco-TruSpec CN* (LECO Corp., St Joseph, MI, EE. UU.) tras combustión seca (LECO 2008). El contenido mineral total se determinó mediante el método de digestión con HNO₃ 65%: HCl 35% (1: 3; v: v) (Chen y Ma 2001), seguido de un análisis mediante espectrometría

de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (*ICP 720-ES, Agilent, Santa Clara, USA*).

Análisis enzimáticos

Las actividades de las enzimas deshidrogenasa, beta-glucosidasa, fosfatasa y ureasa se determinaron según lo descrito en Benítez et al. (2006).

Tratamiento de datos

Todos los resultados bioquímicos son el promedio de 12 repeticiones (tres por planta). Los datos de PCR en tiempo real representan el promedio de tres réplicas independientes de extractos de suelo. Los datos se sometieron a análisis de varianza utilizando el programa STATISTICA (*StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE. UU.*) y se usó la prueba de rango múltiple de Duncan para separar las medias con un nivel de significación de 0.05. Se construyeron gráficos "sun-ray" (Dilly y Blume 1998) para mostrar gráficamente las actividades enzimáticas de los diferentes tratamientos. Las secuencias, obtenidas tras la secuenciación de una muestra conjunta por planta mediante *Illumina MiSeq*, fueron unidas, filtradas en función de su longitud y de la calidad de sus bases, y asignadas a especies putativas o unidades taxonómicas operativas (OTUs) mediante el programa SEED2 (Vetrovsky et al. 2018). Los OTUs fueron asignados taxonómicamente mediante el programa Mothur (www.mothur.org) utilizando la base de datos SILVA, y analizados posteriormente mediante la herramienta bioinformática *Microbiome Analyst* (Dhariwal et al. 2017), mediante la cual se obtuvieron las frecuencias relativas de cada muestra a nivel taxonómico de orden, así como los resultados de alfa- (riqueza de especies en cada tratamiento) y beta- diversidad (diversidad entre tratamientos).

Resultados

La **Figura 1** muestra la actividad bioquímica en la rizosfera de las 5 plantas ensayadas y en el control de suelo desnudo. Todas las plantas aumentaron de forma significativa las actividades de enzimas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del C (beta-glucosidasa), N (ureasa) y P (fosfatasa alcalina) en el suelo, así como la actividad microbiana del mismo, estimada como actividad deshidrogenasa. De igual forma, el contenido de nutrientes del suelo fue mayor en suelos bajo cobertura vegetal, variación que estuvo relacionada con la especie de planta ensayada (**Tabla 2**).

Asimismo, se evidenció un aumento de la biomasa bacteriana total, la cual fue similar en la rizosfera de todas las especies vegetales (**Tabla 3**). Sin embargo, la biomasa de bacterias activas entendida como el número de copias de genes transcritos en el periodo estacional de máxima actividad en el que se realizó el muestreo, siguió una tendencia diferente. Así, aunque todas las especies vegetales aumentaron la biomasa activa de bacterias respecto al suelo desnudo, la rizosfera de *P. angustifolia* presentó una actividad extraordinariamente mayor que el resto de plantas ensayadas. Asimismo, *E. fragilis* y *T. hyemalis* determinaron una actividad de bacterias rizosféricas significativamente mayor que *R. officinalis* y *G. umbellata*.

La especie vegetal condicionó asimismo la estructura de la población bacteriana de la rizosfera, y del mismo modo se detectaron diferencias entre población total y población activa. Respecto a la población total, todas las especies vegetales aumentaron de forma significativa la riqueza de especies bacterianas, estimada como diversidad alfa, de la rizosfera (**Fig. 2a**). La proporción relativa de

bacterias pertenecientes a la mayoría de clases detectadas fue mayor en la rizosfera de *P. angustifolia* y *E. fragilis* con respecto al suelo desnudo, a excepción en esta última de una menor proporción relativa de oligotrofos pertenecientes a las clases *Verrucomicrobiae* y *Acidobacteria* (**Fig. 3**). *R. officinalis* condicionó en su rizosfera una menor proporción de ciertas clases de oligotrofos como *Acidobacteria* y el aumento de ciertos copiotrofos tales como *Gammna-* y *Betaproteobacteria*. *G. umbellata* y *T. hyemalis* mostraron una estructura de población de bacterias con mayor proporción de las clases *Clostridia* y *Acidobacteria* en relación al control. Una visión global de las diferencias entre las estructuras de los tratamientos viene reflejada en los valores de diversidad beta (**Fig. 2c**). Sin embargo, al considerar la población de bacterias activas (basadas en análisis ARN), la estructura mostró una tendencia diferente, con menor abundancia relativa de bacterias copiotrofas en *G. umbellata*, *T. hyemalis* y *E. fragilis* en relación al control (**Fig. 4**), agrupados además en un mismo grupo de diversidad beta (**Fig. 2d**). La rizosfera de *P. angustifolia* mostró más población activa de la mayoría de las clases detectadas respecto al resto de tratamientos, a excepción de algunas clases de oligotrofos menos abundantes respecto al suelo desnudo.

La predicción de funciones a partir de las secuencias de bacterias y mediante herramientas bioinformáticas se muestra en la **figura 5**. Basado en metabolismo KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto), también se observaron diferencias entre especies vegetales y entre las funciones potenciales de la población total y activa en un momento de máxima actividad estacional, fundamentalmente en el metabolismo energético (síntesis de ATP a partir de nutrientes) y degradación de compuestos recalcitrantes.

Tabla 2. Ratio entre el contenido de los principales nutrientes en la rizosfera de las diferentes especies vegetales y en el control de suelo desnudo. Para cada ratio, valores con diferente letra muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Table 2. Main nutrients ratio in the rhizosphere of the different plant species and in the bare soil control. For each ratio, significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$).

	C/N	C/P	N/P
Control	4.77 b	6.95 c	1.46 b
<i>G. umbellata</i>	9.65 a	16.6 a	1.72 a
<i>T. hyemalis</i>	10.9 a	12.0 b	1.10 c
<i>P. angustifolia</i>	9.91 a	9.64 c	0.97 c
<i>E. fragilis</i>	10.1 a	13.6 b	1.34 b
<i>R. officinalis</i>	12.2 a	12.7 bc	1.05 c

Tabla 3. Abundancia de bacterias totales (número de copias del gen 16S rRNA g^{-1}) y metabólicamente activas (número de copias de transcritos del gen 16S rRNA g^{-1}) en la rizosfera de las diferentes especies vegetales y en el control de suelo desnudo. Parámetros con diferente letra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

Table 3. Total (16S rRNA gene copies g^{-1}) and active (16S rRNA transcript copies g^{-1}) bacterial biomass in the rhizosphere of the different plant species and in the bare soil control. For each ratio, significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$).

	Bacterias totales	Bacterias activas
Control	2.06 x 10 ⁹ ± 1.40 x10 ⁸ b	2.02 x 10 ⁷ ± 1.12 x10 ⁶ d
<i>G. umbellata</i>	6.97 x 10 ⁹ ± 4.58 x10 ⁸ a	1.13 x 10 ⁸ ± 8.23 x10 ⁶ c
<i>T. hyemalis</i>	7.89 x 10 ⁹ ± 2.66 x10 ⁸ a	2.80 x 10 ⁸ ± 6.85 x10 ⁶ b
<i>P. angustifolia</i>	8.35 x 10 ⁹ ± 3.06 x10 ⁸ a	2.57 x 10 ⁹ ± 1.55 x10 ⁸ a
<i>E. fragilis</i>	7.29 x 10 ⁹ ± 3.86 x10 ⁸ a	4.95 x 10 ⁸ ± 2.19 x10 ⁷ b
<i>R. officinalis</i>	4.22 x 10 ⁹ ± 1.80 x10 ⁸ a	1.72 x 10 ⁸ ± 3.01 x10 ⁶ c

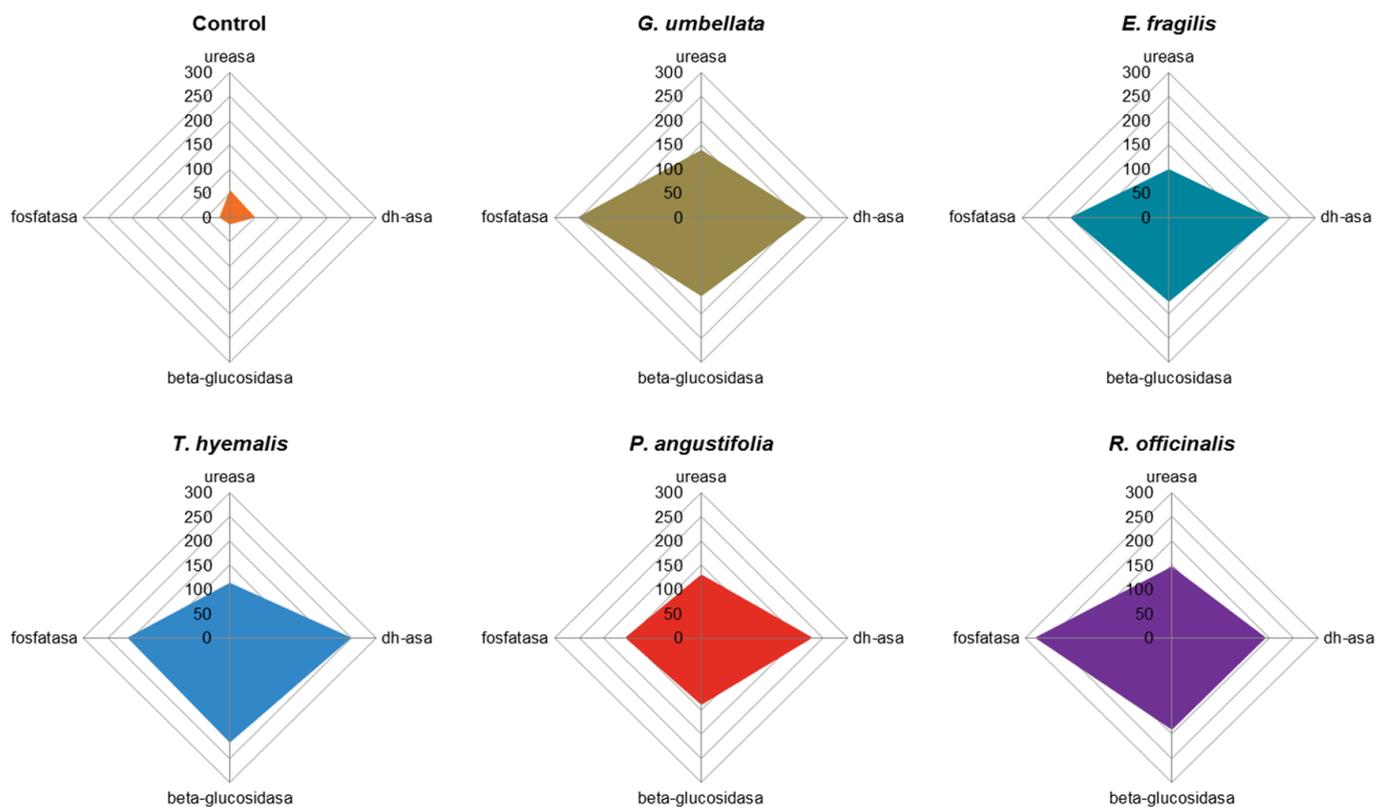


Figura 1. Actividades enzimáticas (deshidrogenasa (dh-asa; $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) $\times 40$, ureasa ($\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) $\times 2$, fosfatasa ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y β -glucosidasa ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$)) en la rizosfera de las diferentes especies vegetales y en el control de suelo desnudo.

Figure 1. Enzyme activities (dehydrogenase (dh-asa; $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) $\times 40$, urease ($\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) $\times 2$, phosphatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$) and β -glucosidase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$)) in the rhizosphere of the different plant species and in the bare soil control.

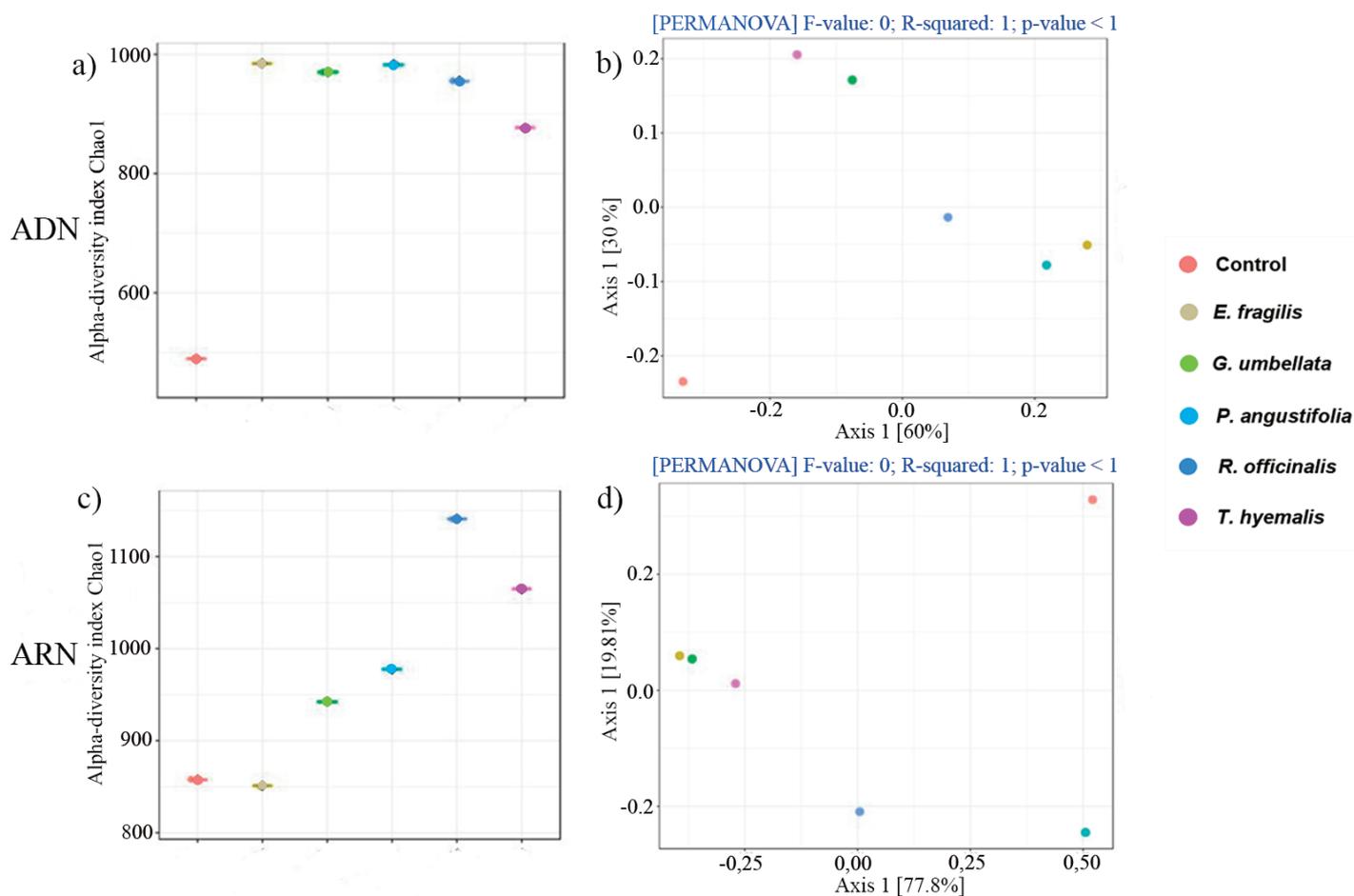


Figura 2. Valores de diversidad alfa (a,c) y beta (b,d) de bacterias totales (ADN) y activas (ARN).

Figure 2. Alfa- (a,c) and beta-diversity of total (DNA) and active (RNA) bacteria.

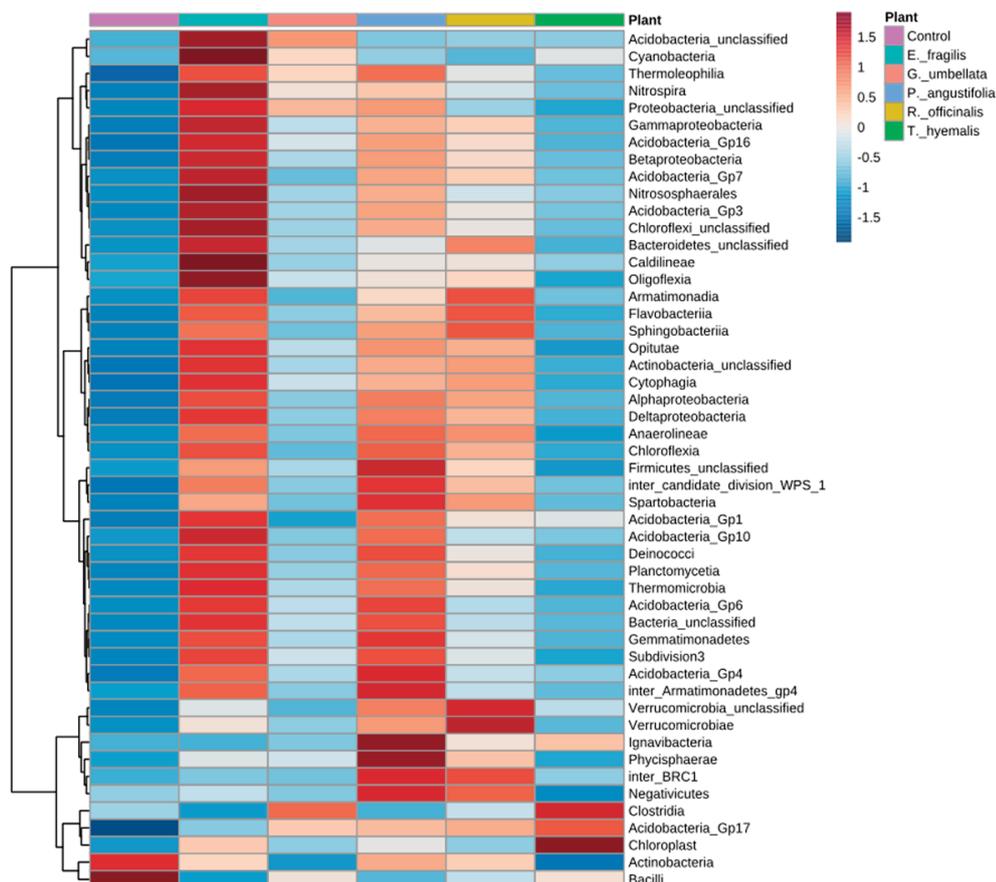


Figura 3. Estructura de la población bacteriana total (ADN) en la rizosfera de las diferentes especies vegetales y en el control de suelo desnudo.

Figure 3. Population structure of total (DNA) bacteria in the rhizosphere of the different plant species and in the bare soil control.

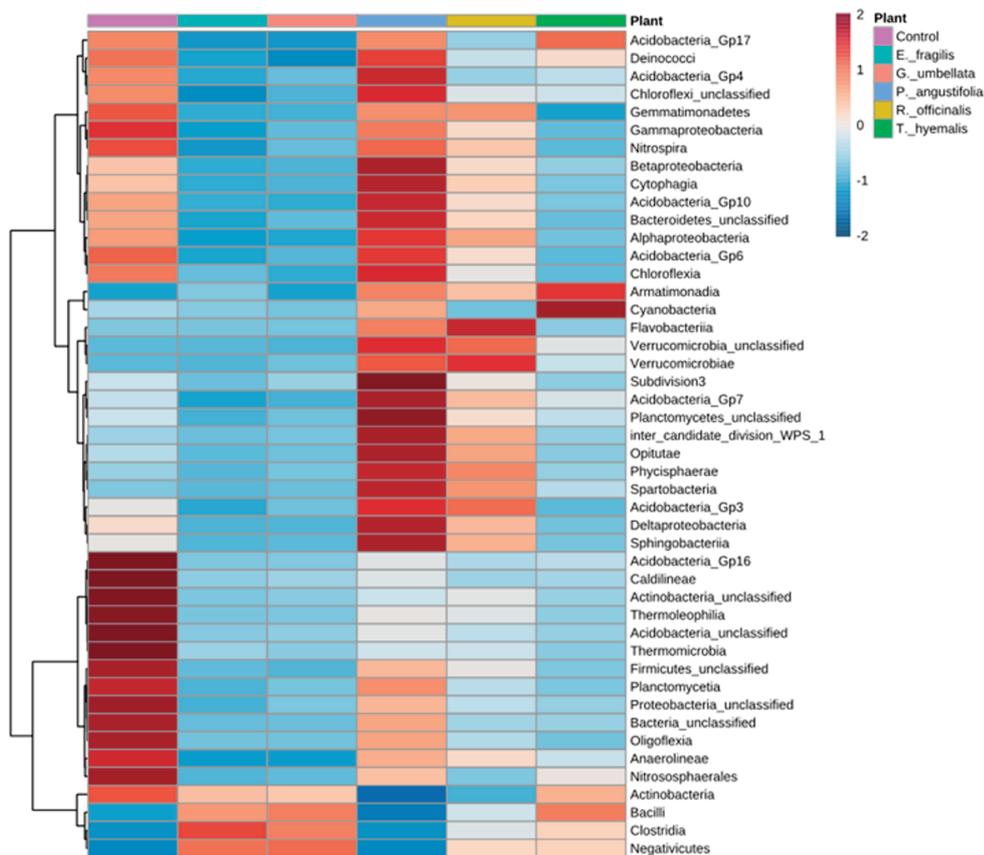


Figura 4. Estructura de la población bacteriana activa (ARN) en la rizosfera de las diferentes especies vegetales y en el control de suelo desnudo.

Figure 4. Population structure of active (RNA) bacteria in the rhizosphere of the different plant species and in the bare soil control.

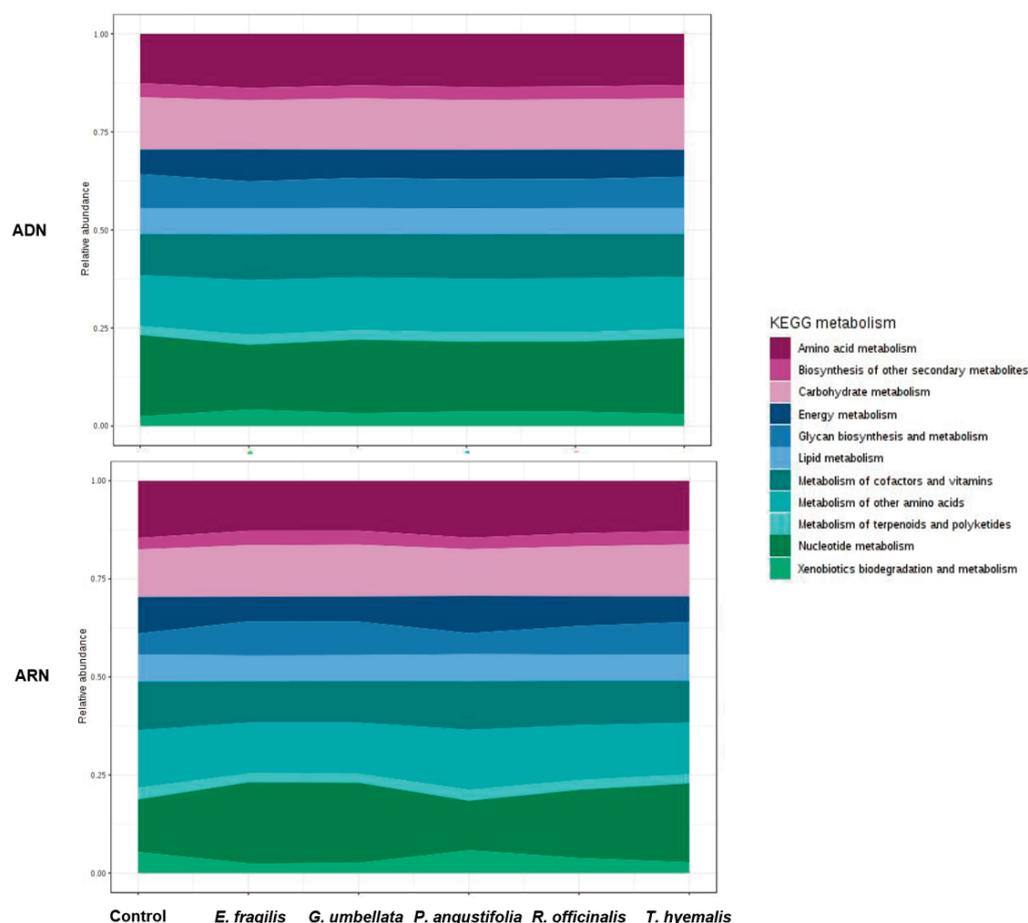


Figura 5. Perfiles funcionales de bacterias totales (ADN) y activas (ARN) en la rizosfera de las diferentes especies vegetales y en el control de suelo desnudo.

Figure 5. Functional profiles of total (DNA) and active (RNA) bacteria in the rhizosphere of the different plant species and in the bare soil control.

Discusión

La presente investigación evidencia el efecto que sobre la mejora de la calidad de un suelo degradado ejerce la revegetación del mismo. Estudios previos han confirmado la viabilidad del uso de diversos parámetros microbianos para evaluar el efecto de diferentes prácticas de manejo sobre numerosos servicios ecosistémicos (Hegnghan et al. 2008; Lei et al. 2018). En este sentido, las actividades de algunos enzimas han sido sugeridas como indicadores de la calidad de un suelo al estar directamente relacionadas con los ciclos de nutrientes y las transformaciones de la materia orgánica y responder rápidamente a los cambios causados por factores naturales y antropogénicos (Benítez et al. 2006; Acosta-Martínez et al. 2008; Moreno et al. 2009). En nuestro estudio la presencia de vegetación aumentó de forma considerable la actividad de enzimas relacionadas con los principales ciclos de nutrientes. Los diagramas de estrella, que permiten una comparación visual y numérica entre muestras -y por tanto han sido propuestos como una huella digital para evaluar la diversidad funcional microbiana (Nannipieri et al. 2002; Moreno et al. 2011), mostraron un área considerablemente superior en la rizosfera de las plantas ensayadas, intuyendo un aumento en la capacidad funcional de los microorganismos del suelo.

A pesar de la aceptación generalizada de la capacidad de las actividades enzimáticas del suelo como bioindicadoras de la calidad del mismo, estas técnicas no permiten la medida de actividades reales, sino la actividad potencial en condiciones ideales. Por tanto, se han propuesto técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos como complementarias (Cañizares et al. 2012). La tendencia es combinar enfoques sobre estudios de ADN y ARN para obtener información sobre la estructura de la comunidad funcional y para discernir las tasas reales de los servicios de los ecosistemas

basados en la actividad microbiana. Mientras que el análisis cuantitativo de ADN proporciona información sobre la estructura de la comunidad correspondiente a la presencia y abundancia de las especies (McCaig et al. 2001), el análisis de ARN brinda acceso al estado transcripcional de la comunidad microbiana (Cañizares et al. 2012), es decir, de su actividad real. El presente estudio evidenció, con respecto al suelo desnudo, un aumento del número de bacterias totales y activas en la rizosfera de las 5 especies vegetales ensayadas. Este aumento en cantidad se tradujo asimismo en un aumento en la riqueza de especies o diversidad alfa, tanto de bacterias totales como activas, en la rizosfera de las plantas, a excepción de los valores similares de riqueza de especies de bacterias activas detectados en el suelo desnudo y la rizosfera de *E. fragilis*. Está generalmente aceptado que una mayor diversidad microbiana en el suelo puede determinar un sistema más estable en cuanto a funciones ecosistémicas y procesos microbianos asociados. Sin embargo, esto no siempre se traduce en verdaderos cambios en la funcionalidad dada la enorme diversidad estructural y funcional que generalmente presentan los suelos. Este efecto, denominado redundancia funcional, implica que una misma función puede ser realizada por diferentes grupos de microorganismos. Sin embargo, algunas hipótesis afirman que, aún sin perderse una función determinada, la eficiencia de ésta podría verse comprometida. En el presente estudio, aun presentando diversidades comparables, la estructura de la población bacteriana activa en la rizosfera de *E. fragilis* difirió significativamente de la presente en el suelo desnudo, siendo similar a la detectada en *G. umbellata* y *T. hyemalis* según los valores de diversidad beta. Esto significó un cambio en la población de bacterias activas hacia un mayor porcentaje de grupos con menor coste energético en generación de energía a partir de nutrientes, tales como *Firmicutes* (*Bacilli* y *Clostridia*), indicando un

cambio de estructura poblacional hacia una mayor proporción de copiotrofos que utilizan menos sustratos recalcitrantes, generalmente estrategias r (Ho et al. 2017). *P. angustifolia* y *R. officinalis* mostraron la tendencia contraria, es decir, una evolución desde suelo desnudo inicial hacia un mayor porcentaje de grupos de oligotrofos tales como *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*, con capacidad para degradar compuestos más recalcitrantes. Es conocido que la estequiometría elemental del suelo (C:N:P) influye directamente en la composición de la comunidad microbiana del mismo (Shen et al. 2019). Como resultado, la variación entre copiotrofos y oligotrofos, generalmente asociados a estrategias r y K respectivamente, fue notable y dependió de la especie vegetal ensayada. En conjunto, los datos sugieren la escasez de sustratos energéticos en el suelo desnudo (relaciones C/N y C/P bajas). En suelos revegetados se detectaron niveles que sugieren una tendencia a suelos equilibrados (C/N entre 8.5 y 11.5) o incluso con exceso de C (C/N > 11.5).

La relación entre el genotipo de la planta y el microbioma rizosférico ha sido objeto de debate en los últimos años. El genotipo de la planta y el tipo de suelo determinan la abundancia, actividad y estructura de la comunidad de los microorganismos del suelo. Se ha demostrado que la composición y estructura de las redes tróficas del suelo varían a escala de plantas individuales y están fuertemente influenciadas por la identidad de la especie de la planta (Bezemer et al. 2010). Así, la diversificación en la estructura de la comunidad del microbioma en la rizosfera ha sido parcialmente evidenciada por la distancia filogenética entre especies vegetales, aunque el grado en que contribuyen a la variabilidad de las comunidades rizobacterianas todavía no se conoce suficientemente (Lei et al. 2018). Mediante un análisis metagenómico, en el presente estudio se estableció una relación entre la comunidad bacteriana del suelo y la especie vegetal bajo la que se desarrolla. Sin embargo, elaborar conclusiones con estos datos podría llevar asociado un cierto riesgo, ya que la fiabilidad del análisis está determinada por la información disponible en las bases de datos públicas, que en numerosas ocasiones no detallan hasta niveles taxonómicos de género o especie. Es por ello que se ha optado por la interpretación de módulos funcionales basada en el análisis directo de las diferentes OTUs, unidades taxonómicas operativas que no se corresponden con una entidad biológica determinada, y que, al ser secuencias genéticas que codifican determinados genes funcionales cuyas rutas metabólicas están generalmente bien estudiadas y definidas, representaría una mayor precisión en la interpretación de los datos obtenidos. De esta forma, los resultados en la predicción de funciones potenciales de la población bacteriana, tanto total como activa, corroboró la hipótesis sobre redundancia funcional de grupos de bacterias, indicando la potencial viabilidad de la mayoría de ellas en todos los suelos estudiados.

El papel crítico que ejerce el suelo en el éxito de un programa de revegetación de tierras degradadas es determinante en la instalación de Infraestructuras Ecológicas destinadas al control biológico por conservación de plagas, como es el caso del estudio que nos ocupa. Dado que las relaciones funcionales entre el suelo y la parte aérea son fundamentales para asegurar la viabilidad de las Infraestructuras Ecológicas, la selección de plantas que mejoran el suelo debería ser un claro punto de partida. Los resultados derivados de esta investigación indicaron que todas las especies vegetales seleccionadas determinaron, en la correspondiente zona rizosférica y a pesar de establecer ciertas diferencias, una población de bacterias lo suficientemente estructurada para asegurar que la mayoría de las funciones metabólicas relacionadas con la actividad bacteriana tengan lugar, indicando la idoneidad de todas ellas para ser utilizadas en un programa de restauración de suelos degradados ligado al establecimiento de Infraestructuras Ecológicas.

Agradecimientos

El presente estudio ha sido financiado por el proyecto RECURPERA 2020 Ministerio de Economía y Competitividad-CSIC.

Referencias

- Acosta-Martínez, V., Acosta-Mercado, D., Sotomayor-Ramírez, D., Cruz-Rodríguez, L. 2008. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils, *Applied Soil Ecology* 8: 249–260.
- Barbosa, P. 1998. Conservation Biological Control. Academic Press, Nueva York, Estados Unidos. 396 pp.
- Benítez, E., Nogales, R., Campos, M., Ruano, F. 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Applied Soil Ecology* 32: 221–231.
- Benítez, E., Paredes, D., Rodríguez, E., Aldana, D., González, M., Nogales, R., Campos, M., Moreno, B. 2017. Bottom-up effects on herbivore-induced plant defences: a case study based on compositional patterns of rhizosphere microbial communities. *Scientific Reports* 7: 6251
- Bezemer, T.M., Fountain, M.T., Barea, J.M., Christensen, S., Dekker, S.C., Duyts, H., et al. 2010. Divergent composition but similar function of soil food webs of individual plants: plant species and community effects. *Ecology* 91: 3027–3036
- Boller, E.F., Häni, F., Poehling, H.M. 2004. *Ecological Infrastructures*. IOCB, Lindau, Alemania.
- Cañizares, R., Moreno, B., Benítez, E. 2012. Biochemical characterization with detection and expression of bacterial β -glucosidase encoding genes of a Mediterranean soil under different long-term management practices. *Biology and Fertility of Soils* 48: 651–663.
- Chen, M., Ma, L.Q. 2001. Comparison of three aqua regia digestion methods for twenty Florida soils approved for publication as Florida Agricultural Experiment Station. Journal Series no. R-06802. *Soil Science Society of America Journal* 65: 491–499.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I., Agellon, L.B., Xia, J. 2017. MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research* 45: 180–188.
- Dilly, O., Blume, H.P. 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Advances in GeoEcology* 31: 121–128.
- Fiedler A.K., Landis, D.A., Wratten, S.D. 2008. Maximizing ecosystem services from conservation biological control: The role of habitat management. *Biological Control* 42: 254–271.
- García, Y., Ramírez Suárez, W., Sánchez, S. 2012. Soil quality indicators: a new way to evaluate this resource. Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. *Pastos y Forrajes* 35: 125–137.
- Heneghan, L., Miller, S. P., Baer, S., Callahan, M. A., Montgomery, J., Pavao-Zuckerman, M., Rhoades, C.C., Richardson, S. 2008. Integrating soil ecological knowledge into restoration management. *Restoration Ecology* 16, 608– 617.
- Ho, A., Di Lonardo, D.P., Bodelier, P.L.E. 2017. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 93, fix006.
- Karlen, D.L., Andrews, S.S., Weinhold, B.J., Doran, J.W. 2003. Soil quality: Humankind's foundation for survival a research editorial by conservation professionals. *Journal of Soil and Water Conservation* 58: 171–179.
- Karp, D.S., Mendenhall, C.D., Sandi, R.F., Chaumont, N., Ehrlich, P.R., Hadly, E.A., Daily, G.C. 2013. Forest bolsters bird abundance, pest control and coffee yield. *Ecology Letters* 16:1339–1347.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45:175–201.
- LECO 2008. Organic application notes. Disponible en <http://www.leco.com/>, verificado 29/07/2019.
- Lei, S., Xu, X., Cheng, Z., Xiong, J., Ma, R., Zhang, L., Yang X., Zhu, Y., Zhang, B., Tian, B. 2018. Analysis of the community composition and bacterial diversity of the rhizosphere microbiome across different plant taxa. *MicrobiologyOpen* e762.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I. 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4554–4559.
- Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Cañizares, R., Castro, J., Benítez, E. 2009. Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 131: 333–339.

- Moreno B., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., Benítez, E. 2011. Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators* 11: 1563-1571.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. En: Burns, R.G., Dickm R.P. (eds.), *Enzymes in the environment: activity ecology and applications*, pp 1–33. Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos.
- Pascual, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., et al. 2013. Stimulation of Different Functional Groups of Bacteria by Various Plant Residues as a Driver of Soil Priming Effect. *Ecosystems* 16: 810–822.
- Ramírez, K.S., Geisen, S., Morriën, E., Basten L.S., van der Putten, W.H. 2018. Network Analyses Can Advance Above-Belowground Ecology. *Trends in Plant Science* 23: 759-768.
- Rodríguez, E., Schwarzer, V., Van Der Blom, J., González-Fernández, M. 2012. The selection of insectary plants for landscaping in greenhouse areas of SE Spain. *IOBC WPRS Bulletin* 75: 73-76.
- Rodríguez, E., Van Der Blom, J., González-Fernández, M., Janssen, Dirk. 2014. Plant viruses and native vegetation in Mediterranean greenhouse areas. *Scientia Horticulturae* 165: 171-174.
- Saccá, M.L., Caracciolo, A. B., Di Lenola, M., Grenni, P. 2017. Ecosystem Services Provided By Soil Microorganisms. En: Lukac M., Grenni P., Gamboni M. (eds.), *Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience. Sustainability in Plant and Crop Protection*, pp 9-24. Springer, Cham, Suiza.
- Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T. 2018. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science* 23: 25-41.
- Shen, F., Wu, J., Fan, H., Liu, W., Guo, W., Duan, H., Hu, L., Lei, X., Wei, X. 2019. Soil N/P and C/P ratio regulate the responses of soil microbial community composition and enzyme activities in a long-term nitrogen loaded Chinese fir forest. *Plant and Soil* 1-17.
- Theault, E., Loreau, M. 2006. The relationship between biodiversity and ecosystem functioning in food webs. *Ecological Research* 21: 9-20.
- van der Blom, J., Crisol, E. 2018. Control biológico en cultivos hortícolas, buscando biodiversidad. *Vida rural* 457: 42-46.
- Vetrovsky, T., Baldrian, P., Morais, D. 2018. SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics* 34(13):2292-2294.
- Wardle, D. A. 2002. *Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. Princeton University Press, Princeton, NJ. Estados Unidos.